

# Centro de Investigacion Cientifica y de Educacion Superior de Ensenada

CONTROL BIOLÓGICO DE LA CONTAMINACION  
POR *Vibrio alginolyticus* EN CULTIVOS DE LA  
DIATOMEA *Skeletonema costatum*.

TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS

ROXANA RICO MORA

ENSENADA, B. C. MEXICO. JULIO DE 1995.

**RESUMEN** de la tesis de la M. en C. Roxana Rico Mora presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** en **ECOLOGIA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Julio de 1995.

**CONTROL BIOLÓGICO DE LA CONTAMINACIÓN POR *Vibrio alginolyticus* EN CULTIVOS DE LA DIATOMEA *Skeletonema costatum*.**

Resumen aprobado por:

Se evaluó la posibilidad de utilizar cepas de bacterias productoras de vitamina B<sub>12</sub> para establecer cultivos mixtos con la diatomea *Skeletonema costatum*. Las sustancias extracelulares producidas por *S. costatum* no fueron suficientes para promover el crecimiento de estas bacterias y en algunos casos lo inhibieron. Por lo que se aislaron las bacterias presentes en cultivos no axénicos de esta microalga, cuya coexistencia con *S. costatum* estaba comprobada.

La comunidad bacteriana de *S. costatum* estuvo formada exclusiva y consistentemente de cinco cepas, pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Plesiomonas* y *Aeromonas*. Dos de ellas mostraron actividad antibiótica o bacteriostática contra dos de las otras cepas. Este tipo de comportamiento es probablemente una estrategia de sobrevivencia de estas cepas, que tienen un crecimiento lento y que no pueden competir de otra manera por la baja cantidad de sustrato a su disposición. Ninguna de estas cinco cepas fue patógena para *Artemia franciscana* e inclusive algunas de ellas fueron utilizadas como fuente de alimento.

Ensayos *in vitro* demostraron que la cepa denominada SK-05 puede coexistir con *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, especies de bacterias patógenas para *A. franciscana*.

La adición de la cepa bacteriana SK-05 a los cultivos de *S. costatum* evitó la proliferación de *V. alginolyticus* debido a un proceso de exclusión competitiva. Por lo que

se demuestra que el uso de cultivos mixtos *S. costatum*-SK-05 es útil para el control biológico de *V. alginolyticus*

El uso de este cultivo mixto como dieta para *A. franciscana* no afectó el crecimiento ni la sobrevivencia de este organismo. La biomasa bacteriana no fue suficiente para modificar en forma sustancial la cantidad de alimento, pero afectó su composición proximal, disminuyendo el porcentaje de proteínas de la dieta.

## SUMMARY

### BIOLOGICAL CONTROL OF *Vibrio alginolyticus* CONTAMINATION IN THE DIATOM *Skeletonema costatum* CULTURES.

Several bacteria of known characteristics were grown in mixed cultures with the diatom *Skeletonema costatum*, aiming to avoid contamination with pathogenic *Vibrio* species.

The first trials were with some strains initially described as vitamin B<sub>12</sub> producers, since these could have improved culture conditions for the strictly auxotrophic *S. costatum*.

However, the extracellular products of *S. costatum* were insufficient or even inhibitory to these bacteria. In addition later trials proved that they could only grow on relatively high concentrations of the same substrate which favours growth of several pathogenic *Vibrio* species, and that they had lost their initial characteristic of B<sub>12</sub> producers, which was the main reason for their initial selection.

Later studies concerned five bacteria strains which had been consistently isolated from our non axenic *S. costatum* strain. These were initially characterized as pertaining to the genera *Vibrio* (SK-01 and 02), *Flavobacterium* (SK-03), *Plesiomonas* (SK-04) and *Aeromonas* (SK-05). Although they all coexist in the same environment and share the same pelagic habitat, two strains have an antibiotic or bacteriostatic activity for two of the remaining three, probably as a survival mechanism since they are less efficient than the others in substrate utilization and become quickly nutrient-limited.

None of the strains is pathogenic to *Artemia franciscana* and some were in fact used as food by *Artemia* nauplii.

*In vitro* experiments showed that only one of these strains (SK-05) coexists and competes with two pathogenic *Vibrio* species (*V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*).

Cultures of *S. costatum* inoculated with this strain and later with *V. alginolyticus*, showed a virtual absence of the latter, due to a process of competitive exclusion, since *Vibrio* needs a substrate-rich environment. This is inconsistent with the presence in culture of a bacterium which can use efficiently and maintain an active growth using the exudates of *S. costatum* even at fairly low concentrations.

Mixed cultures of this strain and of *S. costatum* had a lower protein content than that of axenic *S. costatum*, and the low bacteria biomass sustained by the scarce organic substrate was not sufficient for a significant increase of biomass. Even so, *Artemia* survival and growth with this mixed diet was similar to those obtained with axenic *Skeletonema*.

The use of this strain in mixed culture with *S. costatum* would therefore be conducive to improve conditions for any organism susceptible to *V. alginolyticus*, and probably to *V. parahaemolyticus*, which is less competitive than the first at low substrate concentrations.



CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y DE EDUCACION SUPERIOR  
DE ENSENADA



DIVISION DE OCEANOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

**CONTROL BIOLÓGICO DE LA CONTAMINACION POR *Vibrio alginolyticus*  
EN CULTIVOS DE LA DIATOMEA *Skeletonema costatum*.**

TESIS

que para cubrir parcialmete los requisitos necesarios para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:



**ROXANA RICO MORA**

Ensenada, Baja California, julio de 1995.

## DEDICATORIA

**Infinita mente**

para quienes  
han estado a mi lado

con infinito corazón :

Julio Alberto  
y Alberto

Pedazo de cielo,  
pedazo de mar.  
Alas en mi vuelo,  
vela al navegar.

Nelly

Por este  
y todos los futuros  
que nos faltan juntas.

Bety, Raquel, Nora,  
Esther, Rebeca  
Ela, Cristina

Su amistad  
mi mejor cultivo.

Elisa y Tomasón

Por su diástole  
con regreso.

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Doménico Voltolina, Director de esta tesis, por su experiencia y apoyo que fueron base para la realización de este doctorado.

Dr. M. Leonardo Lizárraga Partida, Dr. Jaime Farber Lorda y Dr. Mario Martínez García, por sus comentarios críticos al inicio de este proyecto y durante el desarrollo de la tesis.

Dra. Csezia Nalewajko, por su apoyo y tiempo dedicados como miembro del comité de tesis y durante mi estancia, como estudiante, en su laboratorio en la Universidad de Toronto, Scarborough Campus, Canadá.

Dr. Farooq Azam, por su experiencia y tiempo compartidos durante mi estancia, como estudiante, en su laboratorio en Scripps Institution of Oceanography y durante la revisión de esta tesis.

Oc. Julio Alberto Villaescusa Celaya, por su invaluable ayuda.

En forma especial a las familias Rocha Alonso Maañon, Carriquiri Chequer, Chequer Guijarro y Romano Mungaray por hacerme sentir parte de ellas.

A la maestra María Luisa Pérez Santarrita, por las primeras letras.

M.C. Victoria Orozco Borbón por su asesoría técnica y disponibilidad en el uso de su laboratorio.

M.C. Ramón Cajal Medrano, por la realización de los análisis de carbono orgánico.

Oc. Enrique Valenzuela Espinoza, por proveer el agua de mar.

Por el apoyo y compañía brindados en el laboratorio:

Dra. Beatriz Cordero Esquivel (análisis bioquímicos de microalgas), Dr. Francisco Correa Sandoval (cultivo de *Artemia* sp.), M.C. M. de Lourdes Trujillo Valle (mantenimiento de las cepas de microalgas), Leobardo Montoya Rodríguez (métodos de cultivo y mantenimiento de cepas de bacterias).

Claudia Farfán, Teresa Gutiérrez Wing y Bertha Lavaniegos Espejo, por el ánimo y confianza brindados durante mi estancia en el CICESE.

Dr. Philippe Douillet, por la revisión crítica del proyecto de tesis y de una de las publicaciones resultantes de este trabajo

Annalia Friedenberg-Voltolina, por su hospitalidad durante mi estancia en Toronto, Canadá.

Karla López, por su ayuda incondicional y hacer fácil la parte administrativa.

María Elena Corona, por su disponibilidad y colaboración.

A los técnicos del Departamento de Acuicultura, por su apoyo logístico.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, por mi formación profesional y el apoyo económico brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado a través de una beca de estudios doctorales.

## CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION	1
I.1. Hipótesis de trabajo	11
I.2. Objetivos	11
II. MATERIALES Y METODOS	13
II.1. Obtención y mantenimiento de cepas	13
II.2. Preparación de inóculos y registro de crecimiento	14
II.3. Efectos de las bacterias y de su medio de cultivo sobre <i>Skeletonema costatum</i>	15
II.4. Interacción entre cepas de bacterias	16
II.5. Cuantificación de productos extracelulares de <i>Skeletonema costatum</i>	18
II.6. Análisis proximal de <i>Skeletonema costatum</i> y de bacterias	18
II.6.1. Optimización de la extracción de proteínas de cultivo con bacterias	19
III. RESULTADOS Y DISCUSION	20
III.1. Cuantificación de productos extracelulares de <i>Skeletonema costatum</i>	20
III.2. Utilización bacteriana de sustancias extracelulares de <i>Skeletonema costatum</i>	22
III.3. Selección de sustrato orgánico	24
III.4. Coexistencia bacterias- <i>Skeletonema costatum</i>	26
III.5. Producción de vitamina B12 por cepas de bacterias	31
III.6. Aislamiento de bacterias asociadas a <i>Skeletonema costatum</i>	34
III.7. Selección de cepa bacteriana para establecer cultivos mixtos <i>Skeletonema costatum</i> -bacterias	38
III.7.1. Comparación del crecimiento de las bacterias aisladas de <i>Skeletonema costatum</i> y de <i>Vibrio alginolyticus</i> y <i>V. parahaemolyticus</i>	38
III.7.2. Interacción de <i>Vibrio</i> con las cepas SK-01 a SK-05	41
III.7.3. Crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de <i>Skeletonema costatum</i> a diferentes concentraciones de sustrato orgánico	44

## CONTENIDO (Continuación)

Página

III.7.4. Efecto de las cepas SK sobre el crecimiento de <i>Skeletonema costatum</i>	49
III.8. Exclusión de <i>Vibrio</i> en cultivos mixtos <i>Skeletonema costatum</i> -SK-05	54
III.9. Optimización de extracción de proteínas bacterianas y composición proximal de cultivos mixtos <i>Skeletonema costatum</i> +SK-05	55
III.10. Cultivos mixtos <i>Skeletonema costatum</i> -bacterias como alimento para <i>Artemia franciscana</i>	58
IV. CONCLUSIONES	63
LITERATURA CITADA	66
APENDICES:	78
1. Bacterial interactions in <i>Skeletonema costatum</i> Cleve (Bacillariophyceae) cultures	79
2. Effects of bacterial isolates from <i>Skeletonema costatum</i> cultures on the survival of <i>Artemia franciscana</i> nauplii	94

**Figura****LISTA DE FIGURAS****Página**

- |   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | Curvas de crecimiento de <i>Skeletonema costatum</i> en medio f/2 más 0.1 % de sustrato orgánico. Control, sin sustrato orgánico (●), glicerol (■), ácido glicólico (▲), acetato de amonio (▼).   | 25 |
| 2 | Crecimiento de <i>Skeletonema costatum</i> en medio f/2 más: (a): 0.1 % y (b): 0.01 % de sustrato orgánico. Control, sin sustrato orgánico (●), glicerol (■), glucosa (▲), Zobell (▼)   | 27 |
| 3 | Concentración final (48 horas) de <i>Skeletonema costatum</i> en cultivos axénicos y mixtos con diferentes cepas bacterianas, en número de células ml <sup>-1</sup> .   | 29 |
| 4 | Curvas de crecimiento de <i>Skeletonema costatum</i> axénica (●) y en cultivo mixto con las cepas bacterianas 2008 (■), 2051 (▲) y <i>Bacillus megaterium</i> (▼), respectivamente. a: Biomasa medida como fluorescencia, b: Biomasa medida en unidades de absorbancia. | 30 |
| 5 | Halos de inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas SK-03 (a) y SK-05 (b) por la acción bacteriostática y bactericida de las cepas SK-01 y SK-02, respectivamente.   | 35 |
| 6 | Crecimiento de la cepa SK-05 sobre el tapete bacteriano de las cepas <i>Vibrio alginolyticus</i> (a) y <i>V. parahaemolyticus</i> (b).  | 42 |
| 7 | Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas SK-01 a 05 a diferentes concentraciones de baptopeptona. (●) 0.1 %, (■) 0.01% y (▲) 0.001 %. a: SK-01, b: SK-02, c: SK-03, d: SK-04 y e: SK-05.  | 45 |
| 8 | Crecimiento de <i>Skeletonema costatum</i> en cultivos axénicos (●) y en cultivos mixtos con las cepas de bacterias SK-01 a 05 (■).   | 51 |

TablaLISTA DE TABLASPágina

I	Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación ( $r^2$ ) entre los valores de absorbancia (Abs= absorbancia $\times 10^3$ ) o de fluorescencia (Fluor) y la concentración celular (Y), en número de células $\times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ para las bacterias y número de células $\times 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ para <i>Skeletonema costatum</i> .	17
II	Concentración de carbono orgánico total (COT, en $\text{mg C} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y de material orgánico particulado (MOP, en $\text{mg}$ de peso orgánico seco $\cdot \text{l}^{-1}$ ) en el medio de cultivo f/2 y en cultivos de <i>Skeletonema costatum</i> en fase de crecimiento exponencial (Exp.) y estacionaria (Estac.). P.E.: productos extracelulares de <i>S. costatum</i> , en $\text{mg C} \cdot \text{l}^{-1}$ . *Datos calculados a partir de las mediciones a 48 y 96 horas.	21
III	Tipo de crecimiento de las cepas de bacterias productoras de vitamina B <sub>12</sub> en medio f/2 más productos extracelulares de <i>Skeletonema costatum</i> . 1: crecimiento evidente, colonias mayores de 0.5 mm; 2: puntos diminutos, colonias menores a 0.5 mm; 3: no crecimiento. <i>B. megaterium</i> * no se reportan los datos para el medio estacionario debido a que las réplicas dieron resultados contrastantes. En paréntesis: conclusión de la prueba. (L): limitado; (S): suficiente, candidato posible para pruebas de cultivo mixto; (I): inhibido.	23
IV	Tipo de crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de un cultivo de <i>Skeletonema costatum</i> en medio f/2 más los productos extracelulares de la microalga. 1: crecimiento evidente, colonias mayores de 0.5 mm; 2: puntos diminutos, colonias menores a 0.5 mm; 3: no crecimiento.	33
V	Ensayo de presencia de bacterias libres (1er filtrado) o adheridas a células microalgales (sonicado) en cultivos mixtos de <i>Skeletonema costatum</i> y de las cepas bacterianas SK-01 a 05. X= número promedio de unidades formadoras de colonias $\cdot \text{ml}^{-1}$ . e.e.: error estándar. n= 3.	37

VI	Velocidad de crecimiento ( $\mu$ , en número de divisiones celulares · hora <sup>-1</sup> ) durante las fases de crecimiento exponencial y lento, duración (en horas) de las dos fases, tiempo de generación (tg, en horas) durante cada fase, densidad óptica máxima a las 48 horas (* 24 horas) y número máximo de células · ml <sup>-1</sup> durante la fase estacionaria, de las cinco cepas de bacterias aisladas de cultivos no axénicos de <i>Skeletonema costatum</i> , y de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>V. alginolyticus</i> .	40
VII	Interacciones de <i>Vibrio alginolyticus</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> con las cepas bacterianas SK-01 a 05. Técnica de gota lado a lado (Gil-Turnes, 1988). El primer número indica el área en mm <sup>2</sup> de la colonia de la especie de <i>Vibrio</i> cultivada al lado de la cepa SK indicada en cada línea. El número en paréntesis es la razón entre esta área y la de la colonia de <i>Vibrio</i> cultivada en ausencia de esa bacteria (control).	43
VIII	Características de crecimiento de las cepas bacterianas SK-01 a 05 a concentraciones decrecientes de bactopectona. Lag: tiempo necesario para el inicio de crecimiento. d.o.: densidad óptica a 550 nm. * a 24 horas.	48
IX	Concentraciones promedio de <i>Skeletonema costatum</i> ( $\bar{X}$ : en número de células x 10 <sup>6</sup> · ml <sup>-1</sup> ) y límites de confianza (LC: p=0.05) en cultivos mixtos con (a): mezcla de las cepas bacterianas SK-01 a 05; (b) cepas SK-02, SK-03 y mezcla de las dos y (c) cepas SK-02, SK-05 y mezcla de las dos. Día: día de muestreo.	52
X	Concentración promedio de bacterias (en unidades formadoras de colonias x 10 <sup>6</sup> · ml <sup>-1</sup> ) y límites de confianza (LC: p=0.05) en cultivos de <i>Skeletonema costatum</i> axénico (control) y precolonizados con la cepa bacteriana SK-05, 48 horas después de su contaminación exógena con cultivos de <i>Vibrio alginolyticus</i> (V.A.), en dos ensayos diferentes. En paréntesis % del total de bacterias.	56

<u>Tabla</u>	<u>LISTA DE TABLAS (continuación)</u>	<u>Página</u>
XI	Porcentajes de proteína obtenidos en muestras de las cepas de bacterias SK-02 y SK-05 sometidas a diferentes condiciones de extracción. Normalidad de NaOH (0.5 y 1.0) y exposición (con) o no (sin) a ultrasonido.	57
XII	Composición química bruta en % de peso seco de <i>Skeletonema costatum</i> en cultivos axénicos (sin bacterias) y cultivos mixtos con la cepa bacteriana SK-05, en fases de crecimiento lento y estacionaria (estac.).En paréntesis se presenta el valor del error estándar. n= 5.* La normalidad del NaOH usado en este caso fue de 1.0, el óptimo para bacterias.	59
XIII	Sobrevivencia (%) y crecimiento ( en $\mu\text{m}$ ) promedios de <i>Artemia franciscana</i> alimentada con cultivos de <i>Skeletonema costatum</i> axénica (control) y <i>S. costatum</i> mixta con la cepa bacteriana SK-05. Se presentan además los valores de tamaño inicial y final promedios usados para calcular el crecimiento. LC: límites de confianza. Signif.: significancia de la prueba t de Student. * número total de organismos medidos.	62

# CONTROL BIOLÓGICO DE LA CONTAMINACIÓN POR *Vibrio alginolyticus* EN CULTIVOS DE LA DIATOMEA *Skeletonema costatum*

## I. INTRODUCCIÓN

El papel de las microalgas planctónicas como productores primarios y como fuente de alimento para organismos herbívoros filtroalimentadores ha sido reconocido desde hace tiempo y está bien documentado en la literatura científica (Raymont, 1963; Russell-Hunter, 1970; Berland *et al.*, 1972a). En el caso de las bacterias acuáticas, heterótrofas en su mayoría, éstas se habían considerado hasta hace poco como mineralizadores y recicladores de las sustancias orgánicas derivadas de la muerte o del catabolismo de los organismos acuáticos, sin otra importante función en la cadena trófica. Es sólo en años recientes que se ha establecido que, sin restar su importancia como mineralizadores, deben ser consideradas también como parte de los productores secundarios, ya que sustentan una dinámica red microheterotrófica (Williams, 1981; Azam *et al.*, 1983; Azam, 1984). A su vez, ésta tiene su origen a partir de los productores primarios y secundarios, ya que el crecimiento de este tipo de bacterias depende del material orgánico disuelto producido por el fitoplancton y el zooplancton (Ducklow, 1984; Williams, 1984).

La importancia de la relación entre bacterias y microalgas ha sido estudiada ampliamente. Se sabe por ejemplo que una de las principales fuentes de carbono y de energía para las bacterias son las sustancias orgánicas liberadas extracelularmente por el fitoplancton (Nalewajko, 1977; Larsson y Hagstrom, 1979; Nalewajko *et al.*, 1980; Iturriaga y Zsolnay, 1981; Kogure *et al.*, 1982; Wolter, 1982; Moller, 1983; Riquelme, 1989) y que a su vez las bacterias, al utilizar estos compuestos, ponen a disposición del fitoplancton una serie de nutrientes ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , entre otros), estableciéndose así una retroalimentación metabólica.

Bell y Mitchell (1972) propusieron el término "ficoesfera" para definir la zona, alrededor de un florecimiento de microalgas, donde el crecimiento de las bacterias es

influenciado por los productos algales, e indicaron que el radio de esta zona varía con la fase de crecimiento algal. Kogure *et al.* (1979) encontraron que los productos extracelulares de *Skeletonema costatum*, en fase de crecimiento exponencial, tienen un efecto estimulante sobre las bacterias del género *Flavobacterium*, que tienen una acción de tipo antibiótico para *Pseudomonas* y *Vibrio* y que no hay efecto aparente sobre *Acinetobacter*. Además, algunos de estos efectos cambian con la edad del cultivo de *Skeletonema*.

Una acción de tipo antibiótico se ha reportado también para otras especies de microalgas (Gauthier *et al.*, 1986; Kellam *et al.*, 1988; Kellam y Walker, 1989) y ha sido asociada en términos generales con la producción de diferentes productos extracelulares, cuya concentración y naturaleza dependen de la especie, del medio y de las condiciones de cultivo.

A su vez, el crecimiento algal puede ser influenciado por las bacterias asociadas (De Lucca y Mc Cracken, 1977; Cole, 1982). Algunas microalgas pueden ser inhibidas, como es el caso de *Tetraselmis striata* y *Thalassiosira rotula* con *Pseudomonas aeruginosa* (Berland *et al.*, 1972a y 1972b), aunque esta relación no es muy común, mientras que otras especies crecen mejor en cultivos con bacterias que en cultivos libres de bacterias (Berland *et al.*, 1970).

Este tipo de relación, fue reconocido desde 1936 cuando Johnston especificó que esta dependencia en *Skeletonema costatum*, es debida a que algunas sustancias metabólicas producidas por las bacterias son factores de crecimiento para la microalga (Ukeles y Bishop, 1975). Por ejemplo Starr *et al.* (1957) determinaron la producción de compuestos activos con acción similar a la vitamina B<sub>12</sub> en 34 cepas de bacterias aisladas de ambientes marinos y Provasoli y Pintner (citados por Starr *et al.*, 1957) hacen referencia a trabajos donde se demuestra que la cianocobalamina (B<sub>12</sub>) es un factor de crecimiento para algunas diatomeas y flageladas.

Más recientemente se ha reportado que varias especies de microalgas son auxótrofas, o sea que requieren de una o más vitaminas (Provasoli y Carlucci, 1974; Paasche, 1977) y se ha resaltado que estos requerimientos pueden variar para diferentes especies e inclusive entre clones de la misma especie (Lewin y Lewin, 1960).

Las vitaminas B<sub>12</sub>, la tiamina y la biotina son, en orden de importancia, las únicas requeridas por las microalgas (Provasoli y Carlucci, 1974) y los mismos autores hacen referencia a varios trabajos donde se menciona que las vitaminas disueltas en las aguas marinas y continentales provienen principalmente de la actividad bacteriana, aunque hay también reportes de especies de algas que liberan vitaminas al medio, sobre todo en condiciones de cultivo (Carlucci y Bowes, 1970a y 1970b). Parker (1977) menciona a las bacterias como la principal fuente de vitamina B<sub>12</sub> en mar abierto, mientras que las otras dos pueden ser producidas también por algunas especies del fitoplancton.

*Skeletonema costatum*, *Stephanopyxis turris* y *Gonyaulax polyedra* por ejemplo, producen tiamina y biotina en presencia de 12 ng · l<sup>-1</sup> de B<sub>12</sub> mientras que *Coccolithus (Emiliania) huxleyi* puede producir vitamina B<sub>12</sub> y biotina si el medio contiene 120 ng · l<sup>-1</sup> de tiamina, pero produce sólo biotina cuando la disponibilidad de tiamina es de un orden de magnitud inferior (Carlucci y Bowes, 1970a).

Haines y Guillard (1974) indican que los requerimientos de vitamina B<sub>12</sub> de varias diatomeas en cultivo pueden ser cubiertos por bacterias marinas heterótroficas, aisladas del agua o del sedimento, y que a su vez las bacterias pueden utilizar los productos de excreción de las diatomeas o los restos de las células muertas, como fuente de carbono.

Guillard y Cassie (1963) así como Carlucci y Bowes (1970a) han comprobado que *S. costatum* requiere de la vitamina B<sub>12</sub> y Droop en 1955 (citado por Starr *et al.*, 1957) encontró algo similar, aunque hizo notar que no hay una especificidad en la forma de

vitamina B<sub>12</sub> preferida por esta diatomea, puesto que todos sus análogos, la pseudovitamina B<sub>12</sub>, el factor A y el factor B, pueden ser usados en su lugar.

Los trabajos revisados hasta aquí sugieren que las relaciones bacterias-microalgas son de diferente tipo. Aún con las mismas especies estas relaciones pueden variar, en dependencia de los diferentes productos extracelulares, cuya naturaleza y abundancia dependen básicamente de la fase de crecimiento algal o de la condición fisiológica de las microalgas (Kogure *et al.*, 1982).

Poco se sabe de las bacterias como fuente directa de alimento para los organismos filtradores. Azam (1984), al reconsiderar el papel ecológico del bacterioplancton en el ambiente marino menciona que, como productor secundario, éste representa una de las principales rutas para el flujo de materia y de energía en la red alimenticia pelágica y que una variedad de organismos, sobre todo protozoarios, copépodos y larvas pelágicas de invertebrados bentónicos, utilizan a las bacterias como una fuente de alimento.

Heinle *et al.* (1972) encontraron que el copépodo *Eurytemora affinis* puede alimentarse de algunas bacterias asociadas al detritus y producir exitosamente ovisacos, que es un buen índice de utilización del alimento, aunque en número menor a los producidos cuando se les proporciona microalgas. Jorgensen (1984) por otro lado, describió el consumo de bacterias por larvas de *Mytilus edulis*. En este mismo sentido, Seki y Kennedy (1969) encontraron que los agregados bacterianos pueden ser parte del alimento de organismos filtroalimentadores.

En adultos de moluscos bivalvos se ha observado que durante el proceso de filtroalimentación la eficiencia de retención disminuye con el tamaño de la partícula (Vahl, 1972), ya que partículas mayores de 4 µm son retenidas con un cien por ciento de eficiencia mientras que con partículas menores de 2 µm, tamaño similar y hasta superior al de la mayoría de las células bacterianas, la eficiencia de retención se reduce de hasta un 85 %

(Haven y Morales-Alamo, 1970; Riisgard, 1983). Esto ha hecho pensar que las bacterias no pueden ser una buena fuente de alimento, aunque Haven y Morales Alamo (1970) opinan que, a pesar de su baja eficiencia de filtración con partículas de pequeñas dimensiones, ostiones y otros lamelibranquios pueden obtener buena parte de su nutrición con bacterias y con partículas de tamaño similar. Schleyer (1981) encontró que *Perna perna* filtra partículas menores de  $0.46 \mu\text{m}$  de diámetro y relaciona la disminución de bacterias cocoides de vida libre en el agua con la abundancia de este molusco. El mejillón *Geukensia demissa*, capaz de una clarificación eficiente de bacterias (Wright *et al.*, 1982), es señalado como un ejemplo de un bivalvo que puede afectar la densidad del bacterioplancton (Jorgensen, 1984). Por otro lado, en condiciones experimentales de cultivo, Amouroux (1986) observó que las bacterias del género *Lactobacillus* representaron un componente importante en la dieta de la almeja *Venus verrucosa*.

Antes de estos trabajos, Zobell y Feltham (1937) encontraron en sus experimentos que el mejillón *Mytilus californianus* puede ingerir bacterias y que posee enzimas capaces de digerirlas y además resaltan que, si bien no hay muchos animales equipados con mecanismos de filtración lo suficientemente finos para capturar bacterias individuales, la mayoría lo podrían hacer cuando éstas forman agregados de mayor tamaño.

Seiderer *et al.* (1984) reportan la presencia de enzimas bacteriolíticas en el estilete cristalino de *Choromytilus meridionalis* y, después de estimar la biomasa de bacterias durante un ciclo de surgencias-no surgencias y de medir la tasa de filtración de estos mejillones, sugieren que las bacterias de vida libre pueden satisfacer los requerimientos de nitrógeno de estos organismos pero no los de carbono ya que la razón carbono-nitrógeno de la biomasa bacteriana, que es de 3.5, es relativamente baja comparada con la del fitoplancton que es de 6.6 (Seiderer y Newell, 1985). Langdon y Newell (1990) encontraron que sólo durante el verano las bacterias contribuyeron significativamente a los requerimientos de nitrógeno del ostión *Crassostrea virginica* y de nitrógeno y carbono del mejillón *Geukensia*

*demissa*. Similarmente, para la almeja *Mulinia lateralis* Chalermwat *et al.* (1991) mencionan a las bacterias sólo como fuente de proteínas y nutrientes minerales.

Douillet y Langdon (1993) encontraron que la adición de la cepa bacteriana CA2 aumentó la sobrevivencia y el crecimiento de *Crassostrea gigas* en comparación con una dieta de sólo microalgas.

En crustáceos, Moriarty (1976 y 1977) reporta que el camarón *Metapenaeus bennettiae* puede utilizar como alimento a las especies bacterianas *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* y también se ha mencionado a las bacterias (*i.e.* *Pseudomonas* sp.) como fuente de alimento para adultos de *Penaeus japonicus* (Yasuda y Taga, 1978 citado por Okauchi e Hirano, 1986). Para *Artemia* sp. se ha encontrado que las bacterias, además de ser una buena fuente de alimento, contribuyen a la digestión de microalgas cuando son adicionadas en cultivo mixto (Yasuda y Taga, 1980; Intriago y Jones, 1993).

Dentro de la investigación científica, es común que las disciplinas relacionadas con la generación del conocimiento teórico estén alejadas de aquéllas que tienden a una aplicación directa, al punto de notarse una clara separación entre ambas.

En este trabajo se pretende conjuntar dos disciplinas que en la práctica se separaron desde hace tiempo: la Ecología y la Acuicultura, para intentar de controlar un sistema de cultivo mediante la aplicación del conocimiento que se tiene de las relaciones ecológicas entre los organismos en cultivo.

El cultivo de organismos acuáticos requiere, por lo menos en algunas de sus fases, del cultivo de microalgas (Loosanoff y Davis, 1963; Nascimento, 1977; Walsh *et al.*, 1985), cuya producción debe satisfacer en cantidad y calidad las necesidades energéticas y dietéticas de los organismos (De Pauw y Persoone, 1988) y por este motivo, para un mejor

aprovechamiento de la energía proporcionada a los organismos para su mantenimiento, crecimiento y/o maduración sexual, según sea el objetivo, en acuicultura son importantes los estudios orientados a la selección de especies de microalgas y a la determinación de las condiciones de cultivo que maximicen su calidad nutricia.

Se ha visto en ocasiones que la calidad de un cultivo de microalgas, como fuente de alimento para organismos filtroalimentadores, se incrementa con la presencia de bacterias (Costa-Pierce y Craven, 1987) y en general se menciona que los efectos de la adición repetida de alimento con bacterias varían dependiendo de la especie de bacteria introducida (Murchelano y Brown, 1969). Sin embargo, Berland *et al.* (1969, 1970) mencionan que la presencia de bacterias dentro de los cultivos de microalgas es uno de los problemas principales en acuicultura, debido a que sus productos metabólicos pueden crear condiciones perjudiciales tanto para el cultivo de microalgas como para los organismos que se alimentan de él.

Por otro lado, aún cuando se usan cultivos inicialmente axénicos y se toman varias precauciones para intentar de mantenerlos en ese estado, los cultivos algales y sobre todo los cultivos masivos invariablemente llegan a presentar bacterias (Murchelano y Brown, 1969), cuyo efecto puede ser enteramente inofensivo y hasta positivo, dado que pueden contribuir a la mineralización de sustratos orgánicos y servir como fuente de alimento adicional. En otros casos, la presencia de determinadas especies bacterianas puede crear problemas de patogenicidad (Tubiash, 1975).

Se han sugerido varias formas de eliminar las bacterias de los cultivos, tanto algales como de invertebrados marinos (Soli, 1964; Guillard, 1973; Hoshaw y Rosowski, 1973) sobre todo por medio de antibióticos (Droop, 1967; Guillard, 1968; Le Pennec y Prieur, 1977; Sindermann y Lightner, 1988), aunque se sabe que el uso de estos compuestos puede llegar a ser tóxico para los organismos tratados (D'Agostino, 1975; Tubiash, 1975). En particular, Droop (1967) menciona que en cultivos algales es difícil establecer si las

microalgas expuestas a antibióticos han sido dañadas o alteradas, por lo cual el uso de estas sustancias debe de ser estudiado detenidamente.

En hábitats naturales, microalgas y fitoplancton generalmente presentan bacterias asociadas. En los cultivos de microalgas, sobre todo en los masivos, debido a la presencia de altas concentraciones de nutrientes y de productos extracelulares algales, existen siempre las condiciones apropiadas para el asentamiento de una población y más frecuentemente de una comunidad de bacterias heterotróficas. Por este motivo el logro de la condición de axenicidad a través del uso de antibióticos no sólo es prácticamente imposible, ya que como máximo se pueden lograr condiciones de bacteriostasis temporánea, sino que tal logro resulta extremadamente costoso.

Además, hay que considerar que el uso indiscriminado de antibióticos puede resultar en la selección de cepas bacterianas antibiótico-resistentes y que de hecho esta práctica es objeto de intensas críticas de parte de varias organizaciones que se ocupan del control de la calidad del medio ambiente (Capone y Bauer, 1992). Por lo anterior, y en vista de la dificultad de mantener cultivos masivos axénicos, una forma de evitar la presencia de especies no deseadas o patógenas sería la de controlar la estructura de la comunidad bacteriana introduciendo una cepa de bacterias de características conocidas. De esta manera el material orgánico disuelto disponible para el crecimiento bacteriano sería utilizado por esta cepa la cual, al establecerse dentro de los cultivos, modificaría el nicho disponible e impediría el asentamiento de cepas con requerimientos similares o superiores. Este método de control ya ha sido usado por Maeda y Nogami (1989) y Nogami y Maeda (1992) en sistemas de acuicultura. Ventajas adicionales podrían lograrse si esta especie pudiera contribuir al crecimiento de la microalga en cultivo, o a la calidad nutritiva del producto final.

Existen varios trabajos sobre la composición bioquímica de especies de microalgas (Parsons *et al.*, 1961; Myklestad, 1974 y 1977; Chu *et al.*, 1982; Whyte, 1987;

bacteriana, aparte de algunos trabajos en donde se dan indicaciones de tipo general, como el de Seiderer y Newell (1985), mencionado anteriormente, y los de Tagata (1986) y Simon y Azam (1989).

Porras-Aguirre (1984) aisló del tracto digestivo de los camarones *Penaeus aztecus*, *P. duorarum* y *P. setiferus* varias cepas de bacterias que, de acuerdo a la caracterización de Aldana-Godínez (1989), serían productoras de vitamina B<sub>12</sub>. Debido al requerimiento de varias especies de microalgas, como por ejemplo *Skeletonema costatum* y *Thalassiosira pseudonana* para esta vitamina, la presencia de este tipo de bacterias en un cultivo tendría que resultar favorable por su aporte de vitaminas al medio de cultivo.

Entre las varias especies de microalgas usadas en acuicultura, la diatomea *Skeletonema costatum* es considerada tradicionalmente como una fuente de alimento importante para los primeros estadios larvales de camarones peneidos y para el cultivo de *Artemia* (Mock y Neal, 1974; Liao *et al.*, 1983). En los cultivos de estos organismos una de las mayores causas de mortalidad es la presencia de bacterias, principalmente de especies de los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* (Brown, 1973; Murchelano y Bishop, 1975; Muroga *et al.*, 1989). En particular, dentro del género *Vibrio*, las especies *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* son reconocidas por su patogenicidad para *Artemia* sp. (Gunther y Catena, 1980), que es usada ampliamente como alimento para larvas de peces y de camarón (Sorgeloos y Léger, 1990).

La presencia de este tipo de bacterias podría ser controlada si, como se mencionó anteriormente, dentro de los cultivos de *S. costatum* se pudieran introducir una o más cepas bacterianas de comportamiento conocido que, al modificar el nicho disponible, impidieran el asentamiento de las especies patógenas. Si además estas cepas de bacterias fueran productoras de vitamina B<sub>12</sub> extracelular, se podría incrementar el crecimiento de *S. costatum*, dado el requerimiento de esta especie para dicha vitamina.

Por otro lado, si los organismos filtradores alimentados con esta microalga pudieran utilizar bacterias como fuente adicional de alimento, se podría esperar que la presencia de bacterias en un cultivo de microalgas resultaría en un complemento alimenticio, sobre todo por su alto contenido proteínico (Seiderer y Newell, 1985). Se obtendría además un cultivo mixto, que en términos generales es más recomendable que uno monoespecífico (Davis y Guillard, 1958; Epifanio, 1979; Romberger y Epifanio, 1981).

La finalidad del presente trabajo es estudiar la posibilidad de explotar las relaciones interespecíficas entre bacterias-bacterias y bacterias-microalgas, para estabilizar artificialmente un sistema de cultivo. Esto se puede lograr modificando desde un inicio la estructura de la comunidad presente en el cultivo de forma tal que la proliferación de organismos ajenos resulte difícil, si no imposible, a causa de la fuerte interdependencia de las especies de esa comunidad y, posiblemente, por exclusión activa mediante la producción de sustancias alelopáticas (antibióticos).

El estudio de esta técnica, que se ha demostrado efectiva para el control de infecciones de origen micótico en crustáceos (Gil-Turnes *et al.*, 1989; Crisóstomo Vázquez, 1992), está cobrando auge para el control de enfermedades de origen bacteriano en sistemas acuiculturales.

Lamentablemente, aparte de los trabajos de Maeda y Nogami (1989), Nogami y Maeda (1992) y Douillet y Langdon (1994), no se sabe mucho acerca de los logros de esta línea de investigación. De hecho, gran parte de las experiencias se han llevado a cabo en laboratorios comerciales en forma totalmente empírica, con resultados aparentemente contradictorios y no repetibles a causa de las estrictas normas de seguridad industrial bajo las cuales operan esos laboratorios, que impiden la propagación de la información allí generada.

Se sabe a través de fuentes fidedignas que el uso de "probióticos", como equivocadamente se han denominado los cultivos bacterianos que se inoculan directamente a los estanques de cultivo larvario de peneídos, se está difundiendo en la práctica comercial. Cada uno de estos laboratorios tiene su fuente de bacterias, a menudo obtenidas sencillamente enriqueciendo el agua de un cultivo larvario que demostró buen crecimiento y sobrevivencia, lo cual explicaría la falta de repetibilidad de los resultados obtenidos con esta técnica, aunque no faltan los ejemplos de compañías que tienen acceso a alguna cepa específica de bacterias, cuyo tipo y origen son entre los secretos más estrictamente protegidos en la industria camaronícola (Leobardo Montoya y Domenico Voltolina, com. pers.). El encontrar y caracterizar una o más de estas cepas constituiría un avance importante para la acuicultura, además de ofrecer datos valiosos en el campo, todavía no suficientemente explorado, de la ecología del bacterioplancton marino.

### **I.1. Hipótesis de trabajo**

1) La presencia de una población de bacterias y de sus productos extracelulares favorece, o por lo menos no afecta, el crecimiento de la microalga *S. costatum*.

2) La implantación de cepas bacterianas de comportamiento conocido, que utilicen el sustrato orgánico disponible en un cultivo de microalgas, evita el establecimiento de bacterias exógenas, o por lo menos evita su crecimiento excesivo.

3) La alimentación con un cultivo mixto de *S. costatum*-bacterias favorece o por lo menos no afecta el crecimiento y la sobrevivencia de *Artemia franciscana*.

### **I.2. Objetivos**

A fin de definir la trayectoria de investigación a seguir y comprobar las hipótesis planteadas se establecieron los siguientes objetivos:

- 1) Determinar las condiciones de cultivo para que las cepas de bacterias de colección, descritas como productoras de vitamina B<sub>12</sub>, coexistan con *Skeletonema costatum* y establezcan una comunidad estable con esta microalga.
- 2) Determinar si las cepas de bacterias seleccionadas mantienen su capacidad de producir vitamina B<sub>12</sub>.
- 3) Alternativamente, seleccionar otras cepas de bacterias que cumplan por lo menos con las finalidades del primer objetivo.
- 4) Determinar si las cepas de bacterias seleccionadas son patógenas para *Artemia franciscana* y seleccionar entre ellas a la cepa apropiada para el desarrollo del siguiente objetivo.
- 5) Establecer un cultivo mixto *S. costatum*-bacterias y determinar si la cepa de bacteria seleccionada evita o reduce el asentamiento de *Vibrio alginolyticus*.
- 6) Determinar el efecto del cultivo mixto *S. costatum*-bacterias como alimento para *Artemia franciscana*.

## II. MATERIALES Y METODOS

### II. 1. Obtención y mantenimiento de cepas

La cepa de *Skeletonema costatum* (aislamiento clonal SK-C-2) se obtuvo de la colección de microalgas del CICESE (Trujillo Valle, 1993) y se axenizó con baños sucesivos en antibióticos (50 y 100 mg l<sup>-1</sup> de estreptomicina y de penicilina G, respectivamente) durante 12 horas, en combinación con pretratamientos con ultrasonido y lavados por centrifugación (Guillard, 1968; Hoshaw y Rosowski, 1973)

Los cultivos axénicos así obtenidos se mantuvieron en tubos de ensayo de 15 ml con 10 ml de medio f/2 líquido (Guillard y Ryther, 1962), a una temperatura de 15° C y con iluminación continua con un tubo de luz fluorescente blanco frío y uno de luz de día. Las diluciones a medio fresco se hicieron con una frecuencia por lo menos semanal. La axenicidad de la cepa se comprobó mediante observaciones directas por epifluorescencia con el método de anaranjado de acridina (Daley y Hobbie, 1975) y, de ser necesario, se repitió el tratamiento con antibióticos.

Las cepas de bacterias productoras de vitamina B<sub>12</sub> utilizadas en la primera fase experimental de este trabajo fueron facilitadas por el Dr. M.L. Lizárraga Partida del laboratorio de Biotecnología Marina del CICESE y se mantuvieron en medio agar marino Zobell (medio 2216E: Oppenheimer y Zobell, 1952) a 3 ± 1° C.

Para la segunda fase experimental, se aislaron cinco cepas de bacterias de cultivos no axénicos de *Skeletonema costatum*, que se mantuvieron como las anteriores y se caracterizaron de acuerdo a los criterios especificados en Rico-Mora y Voltolina (1995) (apéndice 1).

## II. 2. Preparación de inóculos y registro de crecimiento

Antes de los ensayos con bacterias las cepas, que normalmente se mantienen a  $3 \pm 1^\circ\text{C}$ , se transfirieron a placas nuevas y se incubaron durante cuatro a cinco días a  $25^\circ\text{C}$ , para aclimatarlas a la temperatura experimental y evitar de esta forma anomalías en su velocidad de crecimiento.

Una asada de estos cultivos se transfirió a una serie de tubos de ensayo con 10 ml de medio Zobell líquido, preparado al 20% (Zobell 1/5) de la concentración normal, que se incubaron a  $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , con agitación continua.

El crecimiento se observó por medio de lecturas de absorbancia a 550 nm con un espectrofotómetro HACH EL 2000.

Una vez alcanzada la fase de crecimiento lento, estos cultivos se usaron para inocular nuevos tubos de ensayo con el medio fresco apropiado, según la finalidad del experimento, como se detalla en las secciones correspondientes. El volumen del inóculo fue el necesario para iniciar los cultivos con el mismo valor de absorbancia y poder de esta forma comparar las curvas de crecimiento.

Los incrementos en los valores de absorbancia se registraron a intervalos de tiempo progresivamente crecientes, durante 48 horas. Con estos valores se obtuvieron las curvas y las velocidades de crecimiento respectivas.

En el caso de *S. costatum*, la aclimatación a los varios enriquecimientos orgánicos del medio f/2 se hizo durante un mínimo de cinco-seis generaciones, con base en pruebas de crecimiento preliminares. En este caso el crecimiento se observó por medio de lecturas de absorbancia a 550 nm con el mismo instrumento mencionado para las bacterias y/o con un fluorímetro Turner 112 (Parsons *et al.*, 1984). Similarmente, con estos valores se obtuvieron las curvas y las velocidades de crecimiento respectivas.

### II. 3. Efectos de las bacterias y de su medio de cultivo sobre *Skeletonema costatum*

Los efectos de los sustratos orgánicos usados para favorecer el crecimiento inicial de las varias cepas de bacterias en cultivos mixtos, al igual que los resultantes de la presencia de las bacterias o de sus productos metabólicos, se cuantificaron como diferencias en la velocidad de crecimiento o en la concentración final de células de *Skeletonema costatum* en cultivos con el apropiado tipo de sustrato o de microorganismo.

Mayores particularidades sobre el tipo y la concentración de los sustratos y sobre los criterios de evaluación de los resultados, se detallan en los apartados correspondientes de cada sección.

El efecto de las cepas de bacterias sobre los cultivos de *S. costatum* se determinó con cultivos axénicos de *S. costatum* en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 100 ml de medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) iluminados continuamente con luz fluorescente blanco-frío a una intensidad de  $12 \cdot 10^{15} \text{ Q s}^{-1}\text{cm}^{-2}$ , que se mantuvieron en un baño Neslab a temperatura controlada, a  $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Durante el segundo día, cuando los cultivos estaban en la fase exponencial de crecimiento, se adicionó el volumen necesario de cultivo bacteriano, también en fase exponencial, para alcanzar una concentración inicial de  $10^6$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ , que se usó por ser este el valor que Maeda (1989) menciona como la máxima concentración de bacterias en sistemas acuáticos, incluyendo los sistemas de acuicultura. A los controles sin bacterias se adicionó un volumen similar de agua de mar filtrada a  $0.2 \mu\text{m}$  y esterilizada en autoclave y los datos de concentración de *S. costatum* se obtuvieron mediante fluorimetría, ya que la presencia de bacterias hubiera modificado la densidad óptica de los cultivos, o por conteos directos con el hematocitómetro.

Con el fin de controlar la cantidad de células, bacterianas o de *S. costatum*, adicionada como inóculo o presente en tiempos diferentes durante los ensayos, los datos de absorbancia y/o fluorescencia se transformaron en el correspondiente valor de número de células  $\text{ml}^{-1}$ ,

utilizando las ecuaciones de regresión apropiadas entre los valores de absorbancia, fluorescencia y concentración celular, que se obtuvieron por medio de pruebas de crecimiento llevadas a cabo para este propósito (Tabla I). La concentración celular se determinó por conteo directo, con el hematocitómetro en el caso de *S. costatum* y por epifluorescencia con el método de anaranjado de acridina (Daley y Hobbie, 1975) para las bacterias.

#### **II. 4. Interacción entre cepas de bacterias**

Las interacciones entre las diferentes cepas de bacterias fueron determinadas con el método de difusión de Brock y Madigan (1991) y con la técnica de gota lado a lado de Gil-Turnes (1988)

En el método de difusión, cada cepa fue esparcida en placa en agar Zobell y una gota de 5  $\mu$ l de un cultivo en medio Zobell líquido en fase de crecimiento exponencial de cada una de las otras cepas, fue puesta en una posición conocida de la placa. Las interacciones fueron medidas después de dos, cinco y quince días, considerando la presencia y el tamaño de un halo de inhibición del crecimiento de la cepa base. El control fue una gota de 5  $\mu$ l de medio Zobell líquido estéril.

Para el segundo método, una gota de 5  $\mu$ l de la cepa base fue puesta cerca de una gota de igual volumen de cada una de las otras cepas. Las interacciones fueron evaluadas después de cinco días, usando como criterio la proporción entre el área promedio de cada colonia de la cepa base y la del control, que fue una colonia de la misma cepa base, que creció cerca de una gota de 5  $\mu$ l de medio Zobell estéril. El área de las colonias fue medida utilizando el programa digitalizador de imágenes Sigma Scan (Jandel Scientific). De esta forma, las interacciones pueden ser cualificadas y cuantificadas en forma objetiva, y no subjetivamente como en la descripción original del método. Valores de la proporción inferiores a 1 no solamente indican actividad antibiótica o bacteriostática de la cepa puesta junto a la cepa

Tabla I. Ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación ( $r^2$ ) entre los valores de absorbancia (Abs= absorbancia  $\times 10^3$ ) o de fluorescencia (Fluor) y la concentración celular (Y), en número de células  $\times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$  para las bacterias y número de células  $\times 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  para *Skeletonema costatum*.

C E P A	ECUACION	$r^2$
SK-01	$\log Y = -1.4753 + 1.5321 \log \text{Abs}$	0.98
SK-02	$\log Y = -1.9476 + 1.7634 \log \text{Abs}$	0.97
SK-03	$\log Y = -0.4235 + 1.1342 \log \text{Abs}$	0.89
SK-04	$\log Y = -1.3944 + 1.5597 \log \text{Abs}$	0.95
SK-05	$\log Y = -1.2153 + 1.4434 \log \text{Abs}$	0.93
<i>V. alginolyticus</i>	$\log Y = -0.3013 + 1.0819 \log \text{Abs}$	0.96
<i>V. parahaemolyticus</i>	$\log Y = -0.1164 + 1.0559 \log \text{Abs}$	0.91
<i>Skeletonema costatum</i>	$Y = -8.0716 + 6.3705 \text{ Abs.}$	0.89
	$Y = -14.1398 + 53.7829 \text{ Fluor.}$	0.92

base, sino que una mayor diferencia de este valor se corresponde con una mayor producción o un mayor efecto de la sustancia inhibidora

## II. 5. Cuantificación de productos extracelulares de *Skeletonema costatum*

La concentración del carbono orgánico total y de los productos extracelulares de *S. costatum* se determinó a partir de cultivos axénicos en medio f/2, en recipientes de policarbonato de dos litros de capacidad con un litro de medio.

Muestras del medio inicial antes del inóculo y de los cultivos en fase de crecimiento exponencial y estacionario, se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GFC y filtros Nuclepore con un diámetro de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ . Los filtrados se analizaron con un analizador de carbono orgánico total Beckman Modelo 915B y se estimó también la concentración del material orgánico particulado (biomasa de *S. costatum*) como peso orgánico seco del material presente en los filtros de fibra de vidrio.

La cantidad de productos extracelulares de *S. costatum* se calculó por diferencia entre el valor de carbono orgánico total encontrado en los filtrados de los cultivos en las dos diferentes fases de crecimiento y el medido en el medio de cultivo antes de ser inoculado. El valor obtenido se contrastó con el de la biomasa presente en los cultivos, para calcular el porcentaje de productos extracelulares en función de la fase de crecimiento.

## II. 6. Análisis proximal de *Skeletonema costatum* y de bacterias

Las proteínas de *S. costatum* cultivada en forma axénica fueron extraídas de acuerdo a López Elías (com. pers.) mientras que para las bacterias y los cultivos mixtos de éstas con *S. costatum* se hizo una serie de ensayos a fin de establecer las condiciones de extracción óptimas, que se describen en el siguiente inciso. La estimación de proteínas se hizo por la técnica de Lowry *et al.* (1951) siguiendo las modificaciones de Farber Lorda (1986) y Mayzaud *et al.* (1985). La extracción de carbohidratos se hizo como lo describe Whyte

(1987) mientras que la determinación se hizo con el método de Dubois *et al.* (1956), como se describe en Malara y Charra (1972b). Los lípidos se extrajeron según el método descrito por Bligh y Dyer (1959) con la modificación de Chiaverini (1972) y para su determinación se usó la técnica de Pande *et al.* (1963). El peso seco total y el contenido de cenizas se determinaron de acuerdo a Sorokin (1973). Todos los análisis se hicieron por quintuplicado.

## II. 6. 1. Optimización de la extracción de proteínas de cultivo con bacterias

Las condiciones óptimas para la extracción de proteínas en el cultivo mixto *S. costatum*+ bacterias se establecieron solamente para cultivos con las cepas SK-02 y SK-05, una vez que se determinó que estas dos cepas eran las candidatas más probables para llevar a cabo las pruebas de exclusión de *Vibrio* en cultivos mixtos de *S. costatum*-bacterias.

Las cepas de bacterias fueron cultivadas, hasta el final de su fase de crecimiento exponencial, en medio Zobell (1/5) líquido a 25°C.

Las células bacterianas así producidas fueron cosechadas por centrifugación, lavadas dos veces en agua de mar estéril y resuspendidas en agua de mar estéril. Muestras de 10 ml de la suspensión resultante fueron filtradas en filtros de fibra de vidrio Whatman GF-C para las determinaciones de peso seco, cenizas y extracción de proteínas.

Las condiciones ensayadas para la extracción de proteínas fueron: temperatura, 100°C; tiempo, 100 minutos; normalidad del NaOH, 0.5 y 1.0; sin sonicar y sonicando por 4 minutos. Las condiciones de temperatura y tiempo son las usadas por Dorsey *et al.* (1978) para microalgas que Rivera Padilla(1993) determinó también como aplicables para bacterias. El resto de las condiciones se establecieron de acuerdo a ensayos preliminares.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

#### III. 1. Cuantificación de productos extracelulares de *Skeletonema costatum*

La concentración inicial de carbono orgánico total en el medio f/2 fue de aproximadamente 28.1 mg l<sup>-1</sup> (Tabla II), del cual cerca del 10% se debe a la presencia del quelante orgánico, que no constituye un buen sustrato para la mayoría de las bacterias (Mc Lachlan, 1973) y de las vitaminas, principalmente la tiamina, que se agregan al medio de cultivo (2.81 y 0.12 mg de carbono l<sup>-1</sup> de EDTA y de tiamina, respectivamente).

Durante la fase de crecimiento exponencial, después de dos días de cultivo, la concentración de carbono orgánico total aumentó a 30.13 mg l<sup>-1</sup>, y a 34.7 mg l<sup>-1</sup> en la fase estacionaria (día cuatro de cultivo). Este aumento es claramente debido a la presencia de exudados orgánicos de *S. costatum* y demuestra, de acuerdo con la literatura sobre este tópico (e.g. Hellebust, 1965; Fogg, 1975; Nalewajko, 1977), que la producción de sustancias extracelulares es menor durante la fase de crecimiento exponencial que en la estacionaria. En nuestro caso, los 2.0 mg l<sup>-1</sup> encontrados después de los dos días de la primera fase representan aproximadamente el 4.3% del total de la biomasa de microalgas. En los dos días siguientes *S. costatum* aumentó su biomasa un 59%, mientras que la concentración de productos extracelulares resultó un 230% superior a la medida anteriormente. Considerando un incremento lineal de *S. costatum* durante estos dos días, esto representaría una producción diaria de sustancias extracelulares equivalente a un 3.4% de la cantidad de microalgas en el cultivo, casi el doble de la producida en los dos días de la fase de crecimiento exponencial (Tabla II).

Aunada a la cantidad de sustancia orgánica presente en el agua de mar, que es impredecible debido a la multiplicidad de factores que la determinan, esta acumulación de productos extracelulares representa sin duda alguna un factor de riesgo muy importante, ya que se pueden establecer las condiciones favorables para una rápida proliferación de

Tabla II. Concentración de carbono orgánico total (COT, en  $\text{mg C} \cdot \text{l}^{-1}$ ) y de material orgánico particulado (MOP, en  $\text{mg}$  de peso orgánico seco  $\cdot \text{l}^{-1}$ ) en el medio de cultivo f/2 y en cultivos de *Skeletonema costatum* en fase de crecimiento exponencial (Exp.) y estacionaria (Estac.). P.E.: productos extracelulares de *S. costatum*, en  $\text{mg C} \cdot \text{l}^{-1}$ . \* Crecimiento lento, datos calculados a partir de las mediciones a 48 y 96 horas.

	COT	PE	MOP	PE (%Biomasa)	PE (Prod $\cdot \text{día}^{-1}$ ) (% Biomasa producida en 24 horas)
Medio	28.13	---	---	---	---
Exp. (48 h)	30.13	2.00	46.90	4.26	2.13
Lento * (72 h)	32.16	4.05	60.70	6.64	3.38
Estac. (96 h)	34.70	6.57	74.50	8.80	3.38

bacterias patógenas u oportunistas, que requieren en general de altas concentraciones de sustrato orgánico (Austin, 1988)

### III. 2. Utilización bacteriana de sustancias extracelulares de *Skeletonema costatum*

En este ensayo se determinó si las veinte cepas de bacterias caracterizadas por Aldana-Godínez (1989) como productoras de vitamina B<sub>12</sub> así como *Bacillus megaterium*, que se usó como cepa de referencia, pueden utilizar como sustrato el material orgánico disuelto producido por *S. costatum*

Los productos extracelulares de *S. costatum* en fases de crecimiento exponencial y estacionaria, usados como medios de cultivo (medios exponencial y estacionario, respectivamente), se prepararon de acuerdo a la metodología de Haines (1974).

El crecimiento bacteriano con ambos medios fue evidente solo para las cepas 2008, 2044, 2051, 2097, 2123 y *B. megaterium* (Tabla III). El crecimiento diminuto observado para el medio exponencial en el resto de las cepas indica mayores requerimientos de sustrato orgánico. Este tipo de comportamiento se registró también con el medio estacionario para un 50% de las mismas cepas. Para el resto de las cepas que manifestaron crecimiento diminuto en el medio exponencial, la exposición al medio estacionario resultó en falta de formación de colonias, indicando un efecto antibiótico o bacteriostático de los productos extracelulares de *S. costatum* en esta fase de crecimiento, que posiblemente no se manifestó anteriormente, debido a la menor concentración de estos productos en el medio exponencial.

Así, bajo las condiciones normales de cultivo de *S. costatum*, el crecimiento de la mayoría de estas cepas bacterianas resultaría difícil ya sea porque los productos extracelulares de *S. costatum* lo inhiben o porque los nutrientes orgánicos disponibles no son suficientes para promoverlo.

Tabla III. Tipo de crecimiento de las cepas de bacterias productoras de vitamina B<sub>12</sub> en medio f/2 más productos extracelulares de *Skeletonema costatum*. 1: crecimiento evidente, colonias mayores de 0.5 mm; 2: puntos diminutos, colonias menores a 0.5 mm; 3: no crecimiento. *B. megaterium* \* no se reportan los datos para el medio estacionario debido a que las réplicas dieron resultados contrastantes. En paréntesis: conclusión de la prueba. (L): limitado; (S): suficiente, candidato posible para pruebas de cultivo mixto; (I): inhibido.

Fase Crec.	Exponencial			Estacionaria		
	1	2	3	1	2	3
CEPA						
2001	-	+ (L)	-	-	+ (L)	-
2008	+ (S)	-	-	+ (S)	-	-
2011	-	+ (L)	-	-	+ (L)	-
2016	-	+ (L)	-	-	-	+ (I)
2035	-	+ (L)	-	-	+ (L)	-
2044	+ (S)	-	-	+ (S)	-	-
2050	-	+ (L)	-	-	-	+ (I)
2051	+ (S)	-	-	+ (S)	-	-
2074	-	+ (L)	-	-	-	+ (I)
2089	-	+ (L)	-	-	-	+ (I)
2093	-	+ (L)	-	-	+ (L)	-
2097	+ (S)	-	-	+ (S)	-	-
2123	+ (S)	-	-	+ (S)	-	-
3016	-	+ (L)	-	-	+ (L)	-
3022	-	+ (L)	-	-	-	+ (I)
3029	-	+ (L)	-	-	+ (L)	-
3030	-	+ (L)	-	-	-	+ (I)
3060	-	+ (L)	-	-	+ (L)	-
3070	-	+ (L)	-	-	+ (L)	-
3084	-	+ (L)	-	-	-	+ (I)
<i>B. megaterium</i>	+ (S)	-	-	*		

Con la excepción de una de las réplicas de *Bacillus megaterium*, que no creció en el medio preparado con las sustancias extracelulares de *S. costatum* en fase estacionaria, se notó para las cinco cepas que mostraron crecimiento evidente en ambos tipos de productos extracelulares, un mayor crecimiento con el medio estacionario. Esto demuestra una limitación, real o incipiente, para las cepas productoras de vitamina B<sub>12</sub>, por lo que se investigó la posibilidad de favorecer su crecimiento inicial en cultivos con *S. costatum*, enriqueciendo el medio f/2 con un sustrato orgánico apropiado.

### III. 3. Selección de sustrato orgánico

Una vez determinado que la concentración de sustrato orgánico disponible en los cultivos de *S. costatum* no es suficiente para mantener un crecimiento satisfactorio de la mayoría de las cepas de bacterias productoras de vitamina B<sub>12</sub>, se probó a adicionar un sustrato orgánico que permitiera el establecimiento de la población bacteriana deseada.

La selección del sustrato orgánico adicionado se hizo considerando que las condiciones para su uso eran que éste no perjudicara el crecimiento de *S. costatum* y que fuera un sustrato poco utilizado por bacterias del género *Vibrio*. Su efecto sobre *S. costatum* se determinó comparando las curvas de crecimiento de esta microalga, cultivada en medio f/2 más 0.1% de sustrato orgánico, con las obtenidas en cultivos de control con sólo f/2.

Los sustratos orgánicos probados inicialmente fueron glicolato, acetato de amonio y glicerol, que Bianchi (1976) reporta como los menos utilizados por bacterias marinas vibrioides, con porcentajes de utilización de 3, 33 y 76 %, respectivamente.

A través de estas pruebas se notó que sólo el acetato de amonio afectó significativamente a *S. costatum* (Figura 1) por lo cual, considerando el bajo porcentaje de utilización del glicolato por bacterias de tipo *Vibrio* (3%), se seleccionó este sustrato para las pruebas de crecimiento de las bacterias productoras de vitamina B<sub>12</sub>. Sin embargo,

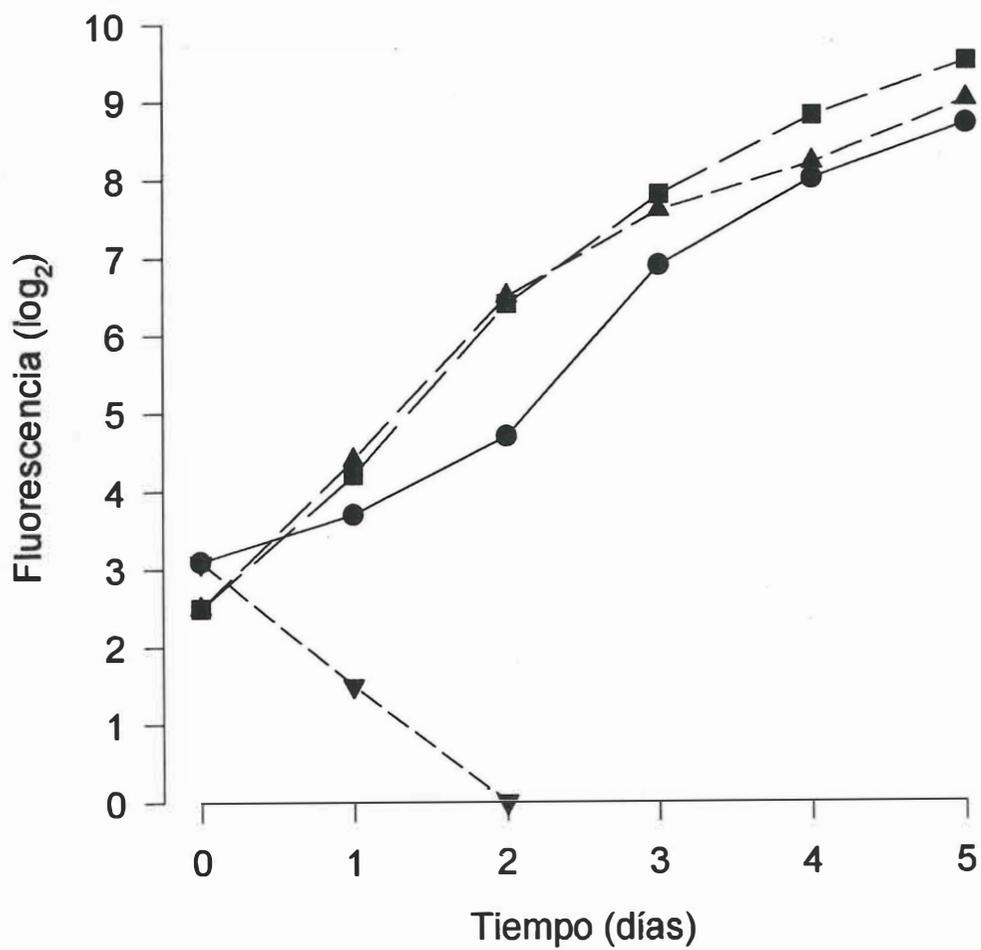


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Skeletonema costatum* en medio f/2 más 0.1 % de sustrato orgánico. Control, sin sustrato orgánico (●), glicerol (■), ácido glicólico (▲), acetato de amonio (▼).

cuando estas cepas se inocularon en medio mineral + 0.1% de glicolato, no se obtuvo crecimiento con ninguna de ellas.

Se realizó un ensayo más con glucosa y con medio Zobell (1/5), sustratos orgánicos usados por Kogure *et al.* (1979) y Fábregas y Veiga (1984), respectivamente. La adición de estos sustratos no afectó el crecimiento de *S. costatum* (Fig. 2a)

Como el objetivo de agregar sustrato orgánico es favorecer el crecimiento bacteriano mientras los productos extracelulares de *S. costatum* son liberados al medio, se bajó la concentración a 0.01 %, el doble de lo usado por Kogure *et al.* (1979) y además se adicionó 0.001 % de  $K_2PO_4$ . Con estas nuevas condiciones se hizo un ensayo con glucosa y con glicerol y, como en los casos anteriores, el crecimiento de *S. costatum* no difirió del control (Fig. 2b), concluyéndose que tanto el glicerol como la glucosa pueden ser adicionados a los cultivos de *S. costatum* para favorecer el establecimiento de la población bacteriana deseada.

En relación a la glucosa, cabe mencionar que aún cuando algunas especies de *Vibrio* la pueden utilizar, situación que trata de evitarse, Bianchi (1976) la considera como un sustrato menos utilizado que el glicerol (65 y 76 %, respectivamente). Por otro lado, no todas las cepas de bacterias productoras de vitamina  $B_{12}$  pueden utilizar glucosa como fuente de carbono (Aldana-Godínez, 1989). Por este motivo no se utilizaron las cepas de bacterias que requieren glicerol, ya que este sustrato es utilizado exitosamente por más especies de *Vibrio* que la glucosa.

#### III. 4. Coexistencia bacterias-*Skeletonema costatum*

De acuerdo a los resultados y a las consideraciones anteriores, las cepas de bacterias seleccionadas para este ensayo podrían ser las siguientes: 2008, 2051, 2097, 2123, 2001, 2011, 2035, 2044, 3060, 3070, 2050, 2074 y *Bacillus megaterium*. La siguiente prueba se

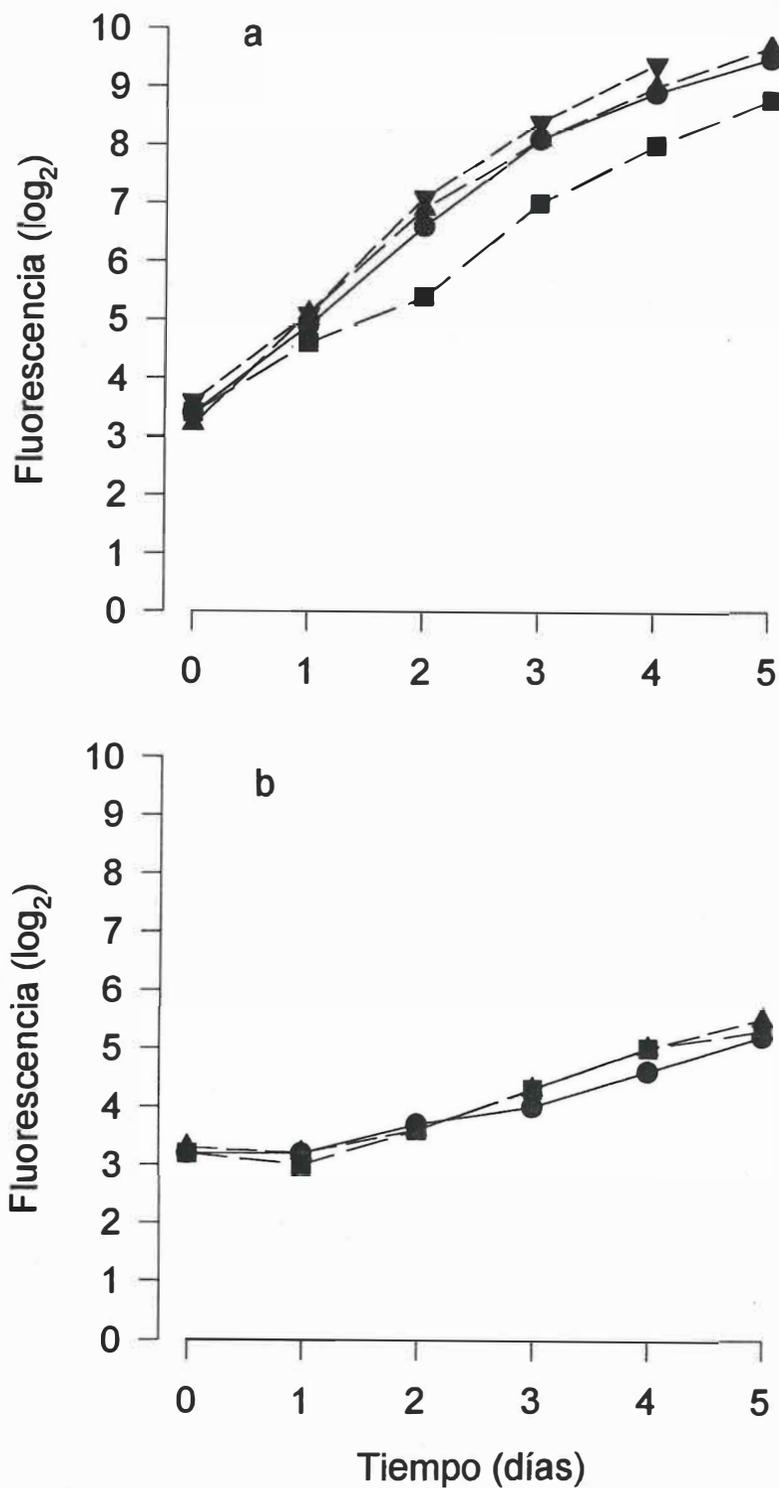


Figura 2. Crecimiento de *Skeletonema costatum* en medio f/2 más: (a): 0.1 % y (b): 0.01 % de sustrato orgánico. Control, sin sustrato orgánico (●), glicerol (■), glucosa (▲), Zobell (▼).

llevó a cabo inicialmente con tres de ellas (2008, 2051 y *B. megaterium*), en paralelo con las dirigidas a investigar y cuantificar, de ser posible, la producción de vitamina B<sub>12</sub> en todas las cepas seleccionadas.

Las bacterias se cultivaron inicialmente en medio Zobell (1/5) líquido durante un tiempo que, en ensayos preliminares, se determinó ser suficiente para alcanzar la fase final de crecimiento exponencial. Después de este tiempo, los cultivos fueron centrifugados, lavados con una solución estéril de NaCl al 2.5% (Kogure *et al.*, 1979) e inoculados en un cultivo axénico de *S. costatum* en fase exponencial, en medio f/2 + 0.01% de glucosa y 0.001% de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

En paralelo, se establecieron cultivos controles de las cepas de bacterias, en los medios f/2 + 0.01 % de glucosa + 0.001 % de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y Zobell (1/5), y cultivos axénicos de *S. costatum*.

El crecimiento en los cultivos mixtos y en los controles se registró por medio de lecturas de fluorescencia y absorbancia.

En términos generales, las lecturas de fluorescencia y el número final de células (Figs. 3 y 4a) mostraron que la presencia de bacterias en los cultivos mixtos no afectó el crecimiento de *S. costatum*. Por otro lado, se esperaba que los incrementos de absorbancia con respecto al tiempo en los cultivos con sólo bacterias se vieran reflejados de manera aditiva en los cultivos mixtos, indicando crecimiento bacteriano. Sin embargo, las lecturas de absorbancia en los cultivos de *Skeletonema* con bacterias no mostraron diferencias con respecto al cultivo axénico, que reflejaran dicho crecimiento (Figura 4b).

Como control adicional para establecer el crecimiento bacteriano, se inoculó en placas con medio Zobell, al inicio y final del ensayo, una muestra de algunos de los cultivos

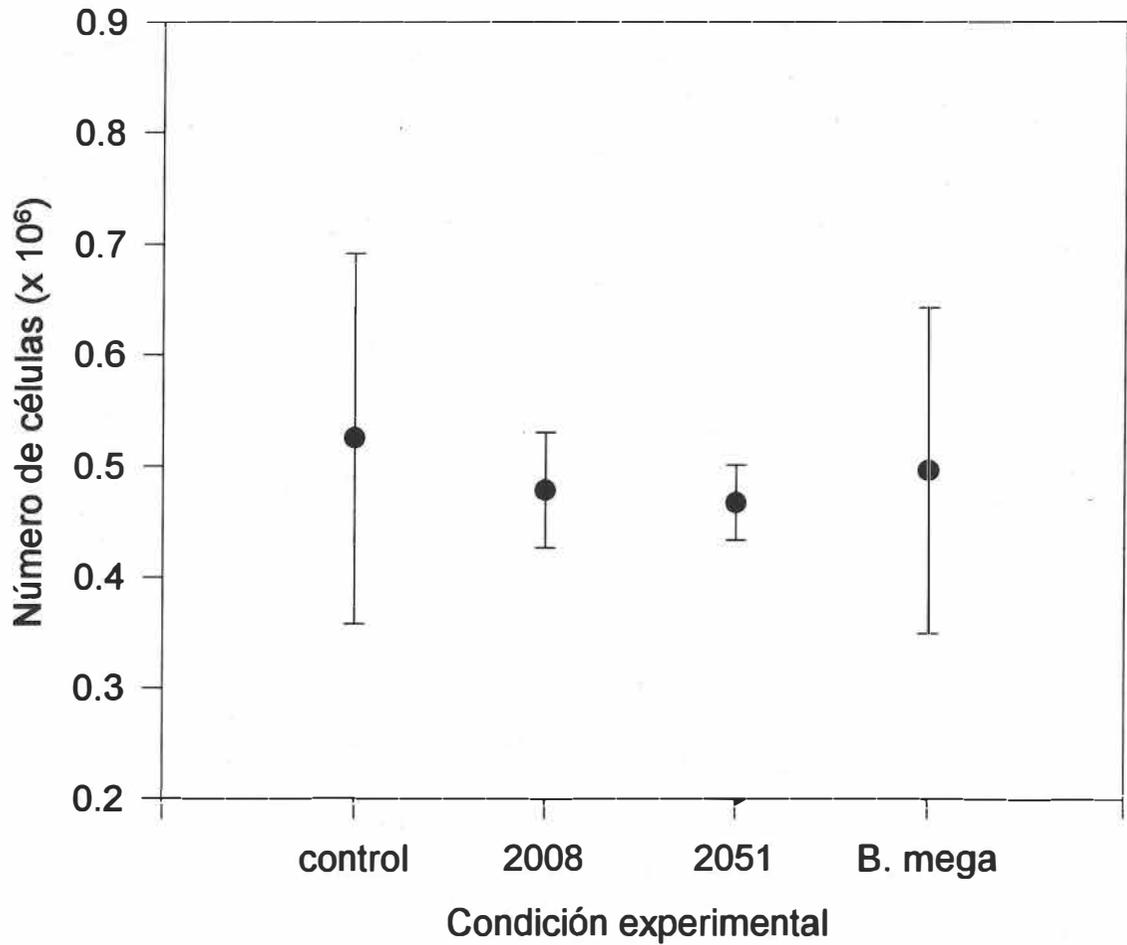


Figura 3. Concentración final (48 horas) de *Skeletonema costatum* en cultivos axénicos y mixtos con diferentes cepas bacterianas, en número de células  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>.

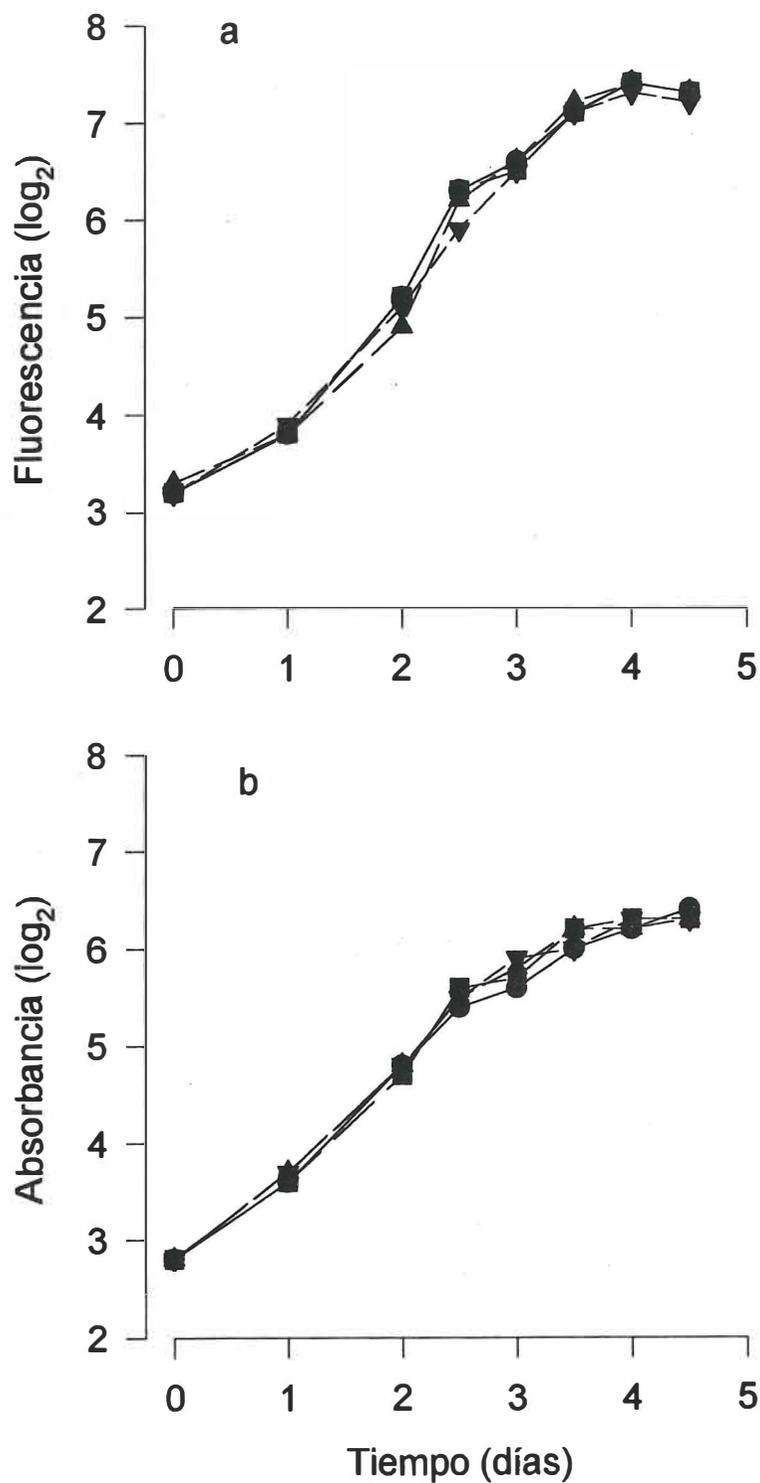


Figura 4. Curvas de crecimiento de *Skeletonema costatum* axénica (●) y en cultivo mixto con las cepas bacterianas 2008 (■), 2051 (▲) y *Bacillus megaterium* (▼), respectivamente. a: Biomasa medida como fluorescencia, b: Biomasa medida en unidades de absorbancia.

experimental y controles. La densidad bacteriana inicial en los cultivos mixtos fue de  $15.3 \times 10^6$ ,  $28.6 \times 10^6$  y  $30.8 \times 10^6$  para *B. megaterium*, 2008 y 2051, respectivamente.

En cuanto a los valores finales, después de 48 horas de incubación, éstos fueron menores a los iniciales, comprobando que no hubo crecimiento bacteriano en los cultivos mixtos.

Los resultados obtenidos en este ensayo así como los obtenidos paralelamente en la prueba siguiente, indicaron la inutilidad de continuar los ensayos de coexistencia con el resto de las cepas enlistadas como potencialmente utilizables.

### III. 5. Producción de vitamina B<sub>12</sub> por cepas de bacterias

A fin de determinar si las cepas de bacterias aún mantenían su capacidad de producir extracelularmente vitamina B<sub>12</sub> se siguió la metodología previamente usada por Aldana Godínez (1989), que utiliza *Escherichia coli* como organismo indicador de la presencia de vitamina B<sub>12</sub> en el medio.

En este ensayo 0.5 µl de las cepas de bacterias productoras de vitamina B<sub>12</sub>, en solución salina, se transfirieron a placas de agar Zobell en posición conocida. Una vez alcanzado un diámetro de 3 mm (48 horas a 25° C), se irradiaron con luz ultravioleta por 30 minutos, con el fin de detener el crecimiento bacteriano y dejar disponibles en el medio los productos extracelulares liberados hasta ese momento

Sobre estas placas se agregó, antes de gelificarse, una capa de medio de ensayo para vitamina B<sub>12</sub> (Difco) al que previamente se le adicionó una suspensión de células de *E. coli*, cultivadas en el medio líquido específico para este ensayo y lavadas dos veces con solución salina.

Las placas así preparadas se incubaron a temperatura ambiente y se revisaron después de 48 y de 72 horas, notándose un crecimiento limitado de *E. coli* sólo en las correspondientes a las cepas 2123 y 3016. Estos resultados contradicen los encontrados al momento de su aislamiento y descripción por Aldana Godínez (1989) y por otro lado confirman que la pérdida de la capacidad de producir algún tipo de metabolito secundario (*i.e.* antibióticos, vitaminas) es común en cepas que han sido transferidas varias veces durante su mantenimiento en condiciones de laboratorio (Brock y Madigan, 1991).

Los resultados anteriores indican la escasa factibilidad de usar las cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de ejemplares sanos de *Penaeus* spp., que se habían seleccionado inicialmente por ser ésta una indicación de su no patogenicidad para peneidos y por su capacidad de producir vitamina B<sub>12</sub>.

Ensayos llevados a cabo en paralelo con cinco cepas de bacterias aisladas de cultivos de *Skeletonema costatum* indicaron que todas estas pueden crecer en medios de cultivo preparados solamente con los productos extracelulares presentes en el medio de cultivo utilizado por esta microalga. La prueba de utilización de este sustrato demostró un crecimiento evidente, independientemente de la fase de crecimiento de *S. costatum*, para cuatro de ellas. SK-01 mostró un crecimiento diminuto en el medio exponencial, que se incrementó a evidente en el estacionario, indicando que la concentración de sustrato orgánico disponible en cultivos de *S. costatum* en fase exponencial permite el establecimiento de esta cepa, pero no es suficiente para su buen crecimiento (Tabla IV).

En los incisos siguientes se presentan los resultados que se obtuvieron con estas cinco cepas, que mostraron una serie de relaciones interesantes entre sí y con la microalga con la cual conviven normalmente.

Tabla IV. Tipo de crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de un cultivo de *Skeletonema costatum* en medio f/2 más los productos extracelulares de la microalga en sus fases exponencial y estacionaria. 1: crecimiento evidente, colonias mayores de 0.5 mm; 2: puntos diminutos, colonias menores a 0.5 mm; 3: no crecimiento.

Fase crec	Exponencial			Estacionaria		
	1	2	3	1	2	3
CEPA	-	+	-	+	-	-
SK-01	-	+	-	+	-	-
SK-02	+	-	-	+	-	-
SK-03	+	-	-	+	-	-
SK-04	+	-	-	+	-	-
SK-05	+	-	-	+	-	-

### III. 6. Aislamiento de bacterias asociadas a *Skeletonema costatum*

Los resultados de la metodología empleada para el aislamiento de las cepas de bacterias asociadas a los cultivos de *Skeletonema costatum* así como sus características morfológicas y bioquímicas y sus interacciones se describen detalladamente en el Apéndice 1 (Rico-Mora y Voltolina, 1995), y se pueden resumir como sigue: dos de las cinco cepas de bacterias que fueron aisladas como componentes normales de la comunidad microbiana presente en los cultivos de la diatomea *Skeletonema costatum*, tienen características de crecimiento que indican que pueden ser rápidamente limitadas por nutrientes. Ambas cepas mostraron actividad antibiótica o bacteriostática contra por lo menos dos de las otras cepas (Figura 5), indicando que esta actividad es probablemente una estrategia de sobrevivencia de estas cepas que tienen un crecimiento lento y que no podrían competir de otra manera por la baja cantidad de sustrato a su disposición.

Además de su capacidad de producir sustancias de tipo antibiótico o bacteriostático, las cepas SK-01 y SK-02 presentan varias características que las ubican aparte de las otras cepas de bacterias que coexisten con *S. costatum*.

En cultivo en placa, las células de SK-01 y SK-02 tienden a adherirse entre sí, lo que hace difícil su separación y suspensión homogénea en medio líquido, en el cual forman una película que se adhiere a las paredes del recipiente de cultivo aunque se agiten continuamente. Las células de las otras cepas (SK-03, SK-04 y SK-05) se mantienen libres aún en medio sólido, lo que facilita su suspensión en los cultivos líquidos.

Las características mencionadas hicieron suponer que dentro de los cultivos de *S. costatum* las cepas SK-01 y SK-02 pudieran estar adheridas a las células de *S. costatum* y que las otras estarían libres en suspensión. Esta separación sería de hecho favorable para las dos primeras cepas, que tienen mayores exigencias por lo que se refiere a concentración de

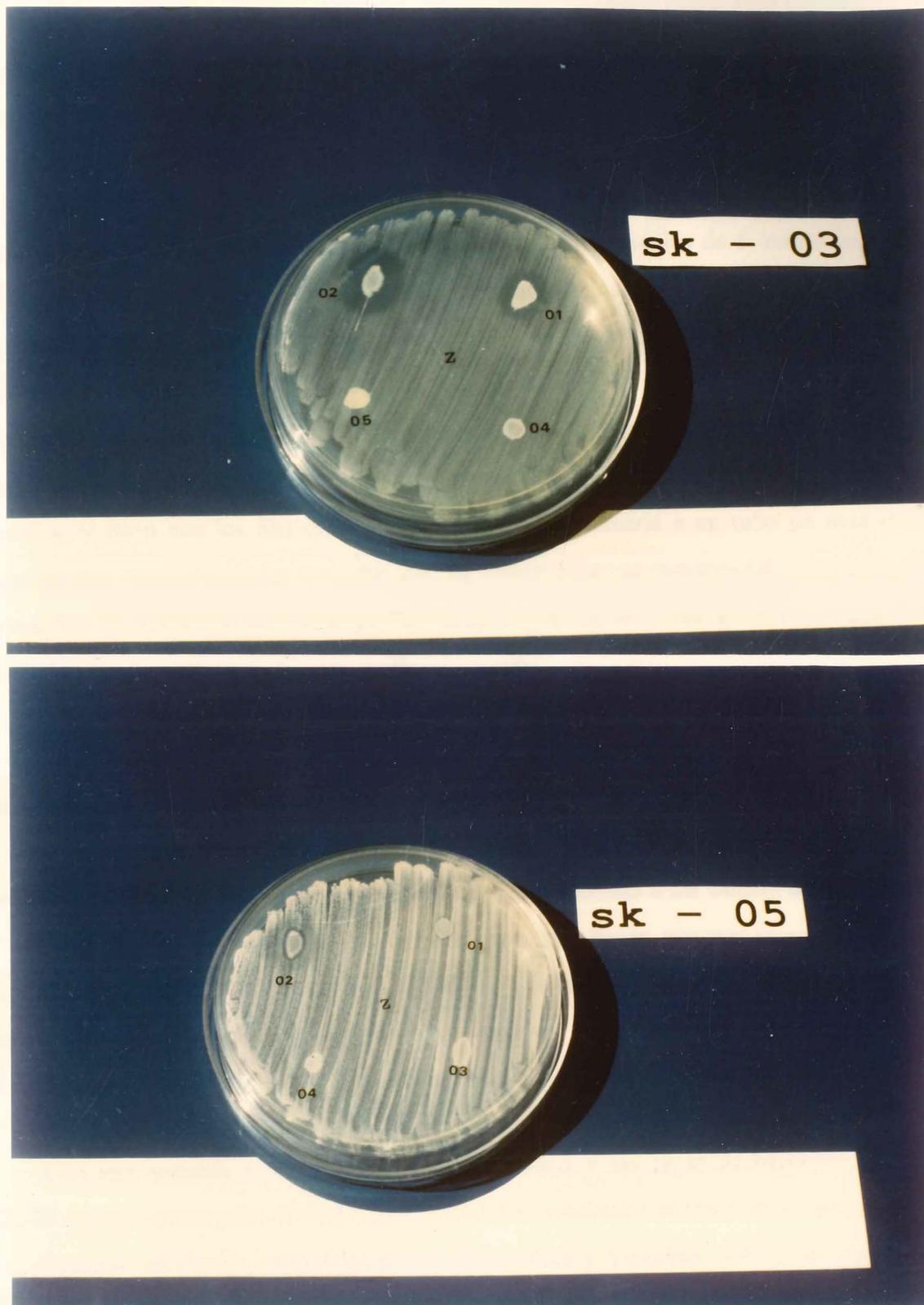


Figura 5. Halos de inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas SK-03 (a) y SK-05 (b) por la acción bacteriostática y bactericida de las cepas SK-01 y SK-02, respectivamente.

sustrato. Además, explicaría más fácilmente la presencia de las otras tres, a pesar de la acción antibiótica de SK-01 y SK-02.

Para determinar si las células de las cinco cepas se encuentran o no en estado libre dentro de los cultivos de *S. costatum*, se inoculó un cultivo axénico de *S. costatum* en fase de crecimiento exponencial con 0.1 ml de cada una de las cepas. Al final de la fase de crecimiento lento, el cultivo se filtró a través de un filtro de membrana con poros de 3  $\mu\text{m}$ . El filtrado resultante se diluyó (1:10 a 1:10<sup>3</sup>) y se sembró en placas de agar Zobell que se incubaron a 25°C durante 5 días. Los filamentos de *S. costatum* en el filtro se lavaron tres veces con agua de mar filtrada a 0.2  $\mu\text{m}$  y esterilizada en autoclave. Después de estos lavados, el filtro con los filamentos de *S. costatum* se transfirió a un tubo de ensayo con agua de mar, tratada como se describió anteriormente. Una vez resuspendidos por agitación suave, los filamentos se sonicaron por un minuto y se filtraron nuevamente a 3  $\mu\text{m}$ . Este segundo filtrado se trató de manera similar al anterior.

Los resultados de la incubación de los dos filtrados indican que todas las cepas se encuentran principalmente en suspensión: las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron de uno a dos órdenes de magnitud más abundantes en el primer filtrado aunque, con la posible excepción de SK-04, se encuentran también adheridas a las células de *S. costatum* (Tabla V). Es interesante resaltar que las dos cepas que tienen mayores requerimientos de sustrato orgánico fueron detectadas en concentraciones muy bajas (SK-01) o no fueron detectadas (SK-02). En el segundo caso esto es probablemente debido a su baja concentración y a la alta dilución de los filtrados que se usaron como inóculos.

Con una segunda serie de pruebas, se determinó si las cepas de bacterias SK-01 a SK-05 son patógenas para *Artemia franciscana*. Los resultados se resumen a continuación y se presentan en detalle en el Apéndice 2 (Rico-Mora y Voltolina, 1995). Se expusieron nauplios axénicos de *Artemia franciscana* a las cinco cepas de bacterias aisladas de cultivos de *Skeletonema costatum* (dos *Vibrio* spp; *Flavobacterium* sp; *Plesiomonas* sp

Tabla V. Ensayo de presencia de bacterias libres (1er filtrado) o adheridas a células microalgales (sonicado) en cultivos mixtos de *Skeletonema costatum* y de las cepas bacterianas SK-01 a 05. X= número promedio de unidades formadoras de colonias  $\cdot \text{ml}^{-1}$ . e.e.: error estándar. n= 3.

	1 <sup>er</sup> filtrado		2 <sup>o</sup> filtrado (sonicado)	
	X	e.e.	X	e.e.
SK-01	10	0	0.5	0.5
SK-02	0	--	0	--
SK-03	795	65	3.0	2.0
SK-04	55	5	0	--
SK-05	680	10	3.5	0.5

y *Aeromonas* sp) y a los conocidos patógenos *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) y *V. alginolyticus* (ATCC 17749). Después de cuatro días, las mortalidades fueron cercanas o iguales al 100% con los dos *Vibrio* patógenos y fueron similares o menores que los tratamientos control (nauplios mantenidos axénicamente) con las otras cepas de bacterias. Esto confirma que *Vibrio parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* son patógenas para *Artemia* y que las otras cinco cepas no lo son. Además, en vista de las mayores sobrevivencias con algunas de éstas, es probable que los nauplios de *Artemia* las puedan utilizar como alimento.

### **III. 7. Selección de cepa bacteriana para establecer cultivos mixtos *Skeletonema costatum*-bacterias**

Para establecer cultivos mixtos de *S. costatum* con bacterias que impidan el crecimiento de *Vibrio*, es necesario que la cepa bacteriana seleccionada no afecte los cultivos de *S. costatum* y que pueda además competir exitosamente con especies de *Vibrio* reconocidas como patógenas.

Una vez establecido que las cepas de bacterias aisladas de *S. costatum* no son patógenas para los nauplios de *Artemia franciscana*, la selección de la cepa bacteriana se hizo después de analizar los resultados de los ensayos siguientes:

#### **III. 7. 1. Comparación del crecimiento de las bacterias aisladas de *Skeletonema costatum* y de *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus***

De acuerdo a los datos obtenidos con cultivos en medio Zobell (1/5) líquido, las cepas de bacterias aisladas de *S. costatum* presentan una fase de crecimiento exponencial de 4 horas de duración con pendientes similares. Diferencias en las fases de crecimiento lento las separan en dos grupos, de los cuales el primero (SK-01 y SK-02) alcanza densidades ópticas máximas (o biomasa máxima) menores a las del segundo (SK-03, SK-04 y SK-05).

Una tendencia similar se observa entre las dos especies de *Vibrio*, ya que la densidad óptica máxima (o biomasa máxima) de *V. parahaemolyticus* es menor a la de *V. alginolyticus*. Las pendientes de su fase de crecimiento exponencial, de sólo dos horas de duración, son similares entre sí pero mayores a las observadas para las bacterias aisladas de *S. costatum* y la densidad óptica máxima de *V. alginolyticus* fue similar a la encontrada para las tres cepas del segundo grupo (Tabla VI).

Considerando las densidades máximas alcanzadas, es evidente que el crecimiento de SK-01 y SK-02 es limitado rápidamente por la disponibilidad de sustrato y que las otras tres cepas son más eficientes en utilizarlo aún en bajas concentraciones, como lo demuestran la velocidad de crecimiento lento, que es cerca del 50% de la del exponencial, y la larga duración de esa fase.

Aún cuando SK-01 y SK-02 pueden coexistir en condiciones normales con las otras tres cepas, probablemente debido a la presencia de una zona exclusiva alrededor de las células bacterianas denominada "bacterioesfera" resultado de su actividad bacteriostática o bactericida, no podrían competir exitosamente con ellas a causa de su alta demanda de sustrato y menos aún con las dos especies patógenas de *Vibrio*, cuya velocidad de crecimiento inicial es entre dos y tres veces superior. Esta mayor velocidad de duplicación causaría una rápida disminución de la sustancia orgánica que sustenta su crecimiento, de forma tal que las cepas SK-01 y SK-02 no podrían alcanzar densidades celulares suficientes para competir por el poco sustrato disponible. Por otro lado, la velocidad de duplicación relativamente alta del segundo grupo de cepas durante la fase de crecimiento lento y la larga duración de esta fase, permiten que estas tres cepas alcancen concentraciones finales iguales o superiores a las de *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* y hacen de ellas las candidatas potenciales para el control biológico de las dos especies de *Vibrio*.

Tabla VI. Velocidad de crecimiento ( $\mu$ , en número de divisiones celulares  $\cdot$  hora $^{-1}$ ) durante las fases de crecimiento exponencial y lento, duración (en horas) de las dos fases, tiempo de generación (tg, en horas) durante cada fase, densidad óptica máxima a las 48 horas (\* 24 horas) y número máximo de células  $\cdot$  ml $^{-1}$  durante la fase estacionaria, de las cinco cepas de bacterias aisladas de cultivos no axénicos de *Skeletonema costatum*, y de *Vibrio parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*.

Cepa	SK-01	SK-02	SK-03	SK-04	SK-05	<i>Vibrio algin.</i>	<i>Vibrio parah.</i>
$\mu$ exponencial (hr $^{-1}$ )	0.26	0.35	0.27	0.27	0.24	0.73	0.72
horas	4	4	4	4	4	2	2
$\mu$ crecim. lento (hr $^{-1}$ )	0.06	0.08	0.18	0.12	0.12	0.09	0.06
horas	4	4	20	20	20	6	6
tg exponencial (hr $^{-1}$ )	3.85	2.86	3.7	3.7	4.17	1.37	1.39
tg crecim. lento (hr $^{-1}$ )	16.67	12.5	5.55	8.33	8.33	11.11	16.67
d.o. max (a 48 hr)	0.198*	0.325	0.851	0.906	0.691	0.888	0.420
Nº cel. max (10 $^6$ )	110	303	794	1,651	764	774	450

### III. 7. 2. Interacción de *Vibrio* con las cepas SK-01 a SK-05

El método de difusión demostró que SK-05 es la única cepa que puede convivir con las dos especies patógenas de *Vibrio*, ya que formó colonias evidentes sobre el tapete de ambas (Figura 6).

Los resultados de la técnica de gota lado a lado demostraron además algunas interacciones interesantes: la presencia de SK-02 aparentemente favorece el crecimiento de ambas especies de *Vibrio*, cuyas colonias aumentaron su superficie en aproximadamente un 200 y un 400 % en el caso de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, respectivamente. En el segundo caso, no se notó la formación de colonias de SK-02.

Además, en la mayoría de los otros casos ( la única excepción fue *V. alginolyticus* en presencia de SK-04) la cercanía de las cepas que coexisten con *S. costatum* causó una reducción del área de las colonias de las dos especies de *Vibrio* que fue más notoria en los casos SK-05-*V. alginolyticus* y SK-01- *V. parahaemolyticus* (Tabla VII). Esta variación del tamaño de las colonias de *Vibrio* fue acompañada en todos los casos por una reducción concomitante de las colonias de la cepa SK inoculada a su lado, indicando competencia por espacio o por nutrientes, más que efectos bacteriostáticos o de antibiosis.

A pesar de la aparente superioridad de SK-01 en el caso de *V. parahaemolyticus*, hay que hacer notar que estas pruebas se hicieron en medio Zobell completo, en el cual la cepa SK-01 puede dividirse sin limitaciones durante un tiempo más largo que ambas especies de *Vibrio* (Tabla VI, inciso 3.7.1.), lo cual explicaría el resultado de esta prueba. Por otro lado, a pesar de su menor velocidad de duplicación, SK-05 compitió exitosamente con *V. alginolyticus* que las pruebas anteriores mostraron como potencialmente más peligrosa, debido a su velocidad de crecimiento que es un 50 % superior en la fase de crecimiento lento a la de *V. parahaemolyticus*, y a su mayor concentración final. La mayor patogenicidad de *V. alginolyticus* quedó evidenciada en los resultados del ensayo descrito en el Apéndice 2,

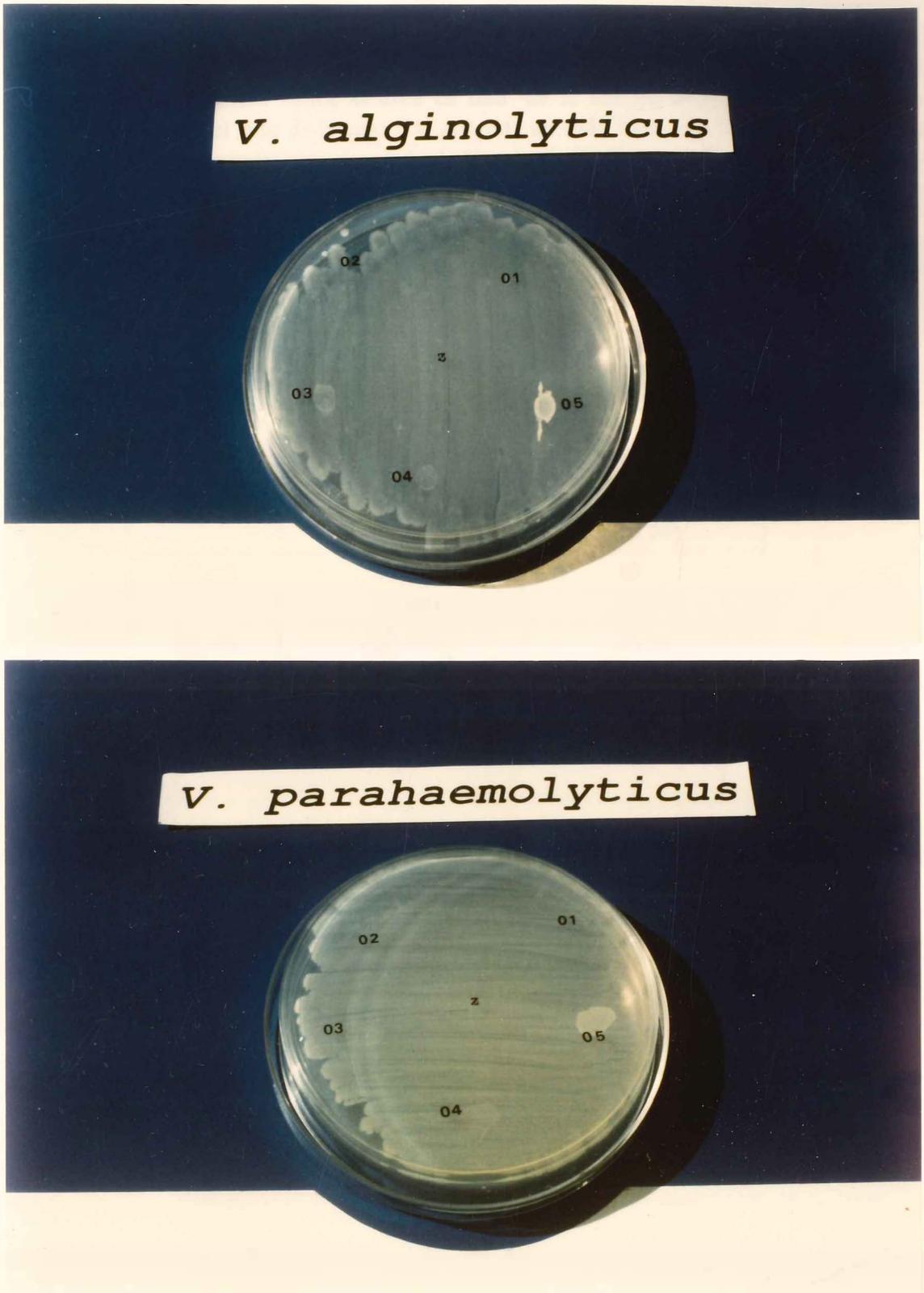


Figura 6. Crecimiento de la cepa SK-05 sobre el tapete bacteriano de las cepas *Vibrio alginolyticus* (a) y *V. parahaemolyticus* (b).

Tabla VII. Interacciones de *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* con las cepas bacterianas SK-01 a 05. Técnica de gota lado a lado (Gil-Turnes, 1988). El primer número indica el área en mm<sup>2</sup> de la colonia de la especie de *Vibrio* cultivada al lado de la cepa SK indicada en cada línea. El número en paréntesis es la razón entre esta área y la de la colonia de *Vibrio* sp cultivada en ausencia de esa bacteria (control).

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Control	93.71	51.17
SK-01	92.84 (0.99)	34.43 (0.67)
SK-02	174.47 (1.86)	192.55 (3.76)
SK-03	93.18 (0.99)	40.28 (0.79)
SK-04	110.19 (1.18)	42.26 (0.82)
SK-05	60.31 (0.64)	42.08 (0.82)

durante el cual los nauplios de *Artemia franciscana* sobrevivieron 24 horas más con *V. parahaemolyticus* que con *V. alginolyticus*.

Por estos motivos la cepa SK-05 fue considerada como el mejor candidato potencial para el control biológico de *Vibrio* en cultivos de *S. costatum*, quedando por demostrar su mayor competitividad, con respecto a las otras, a bajas concentraciones de sustrato

### III. 7. 3. Crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de *Skeletonema costatum* a diferentes concentraciones de sustrato orgánico

El crecimiento de las cepas de bacterias aisladas de *S. costatum* a diferentes concentraciones de sustrato orgánico se comparó con el medio líquido 2216E diluido hasta concentraciones equivalentes al 0.1 (1/5), 0.01 (1/50) y 0.001 % (1/500) con referencia a la concentración de bactopectona (Difco), que tiene aproximadamente un 50% de Carbono orgánico.

El intervalo de concentraciones probado tiene como límite superior las concentraciones usadas para mantener el crecimiento bacteriano en las pruebas anteriores y el límite inferior es menor de las concentraciones encontradas en los cultivos de microalgas.

Las curvas de crecimiento indican un menor incremento de la densidad celular con las concentraciones inferiores de sustrato. Este comportamiento fue más evidente para las cepas SK-01 y 02 (Figura 7a-e), para las cuales el número de divisiones diarias se redujo hasta 0 en la concentración más baja. En las cepas SK-03, SK-04 y SK-05 esta reducción fue menos pronunciada y los valores obtenidos correspondieron a un 20 ó 30 % de los valores observados para la concentración más alta (Tabla VIII).

Esta tendencia a disminuir el valor de  $\mu$  correspondió con un incremento en el número de horas necesarias para que se diera la primera duplicación del número de células. En el caso particular de las cepas SK-01 y SK-02 este incremento fue acompañado por un retardo

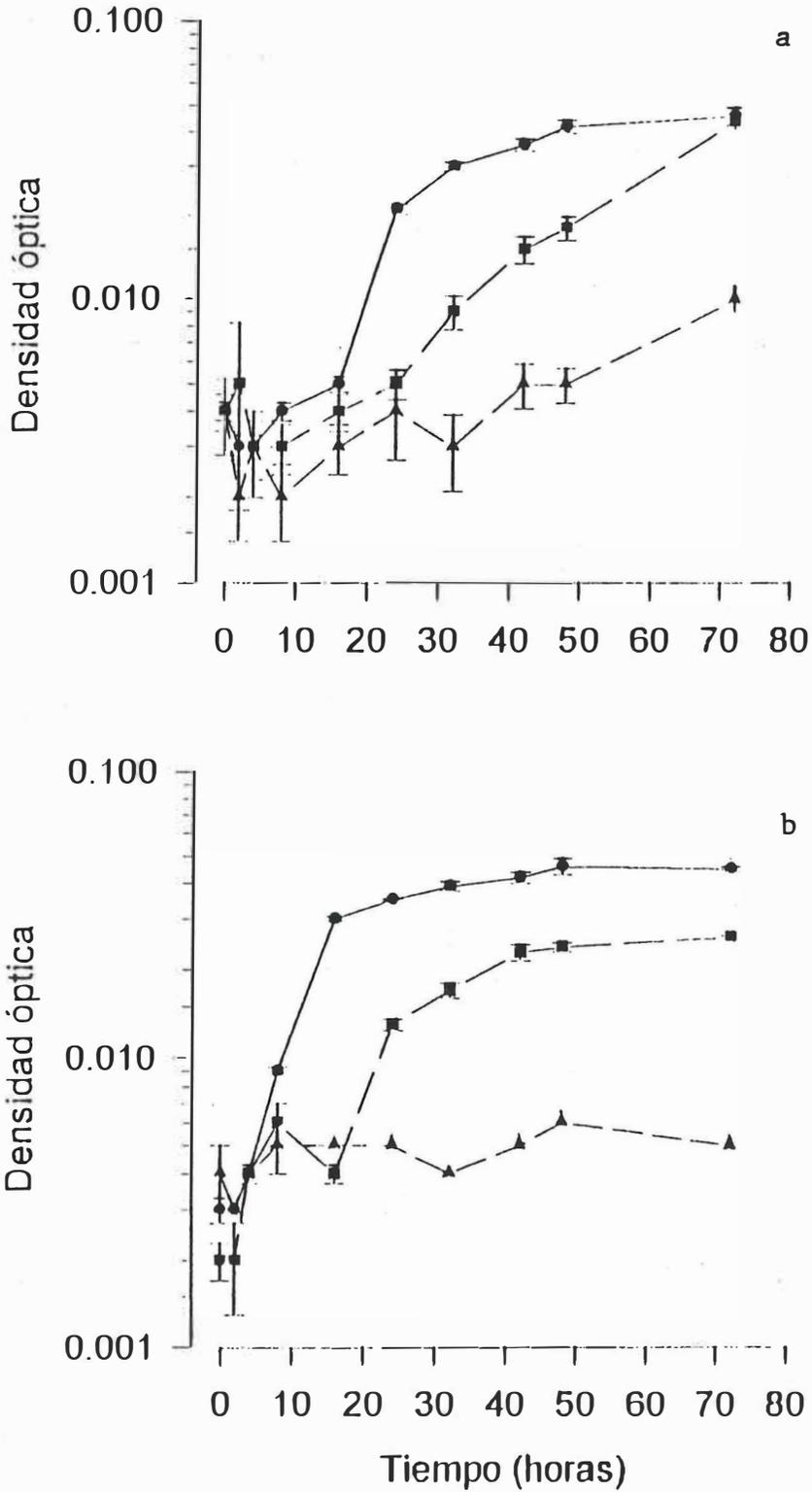
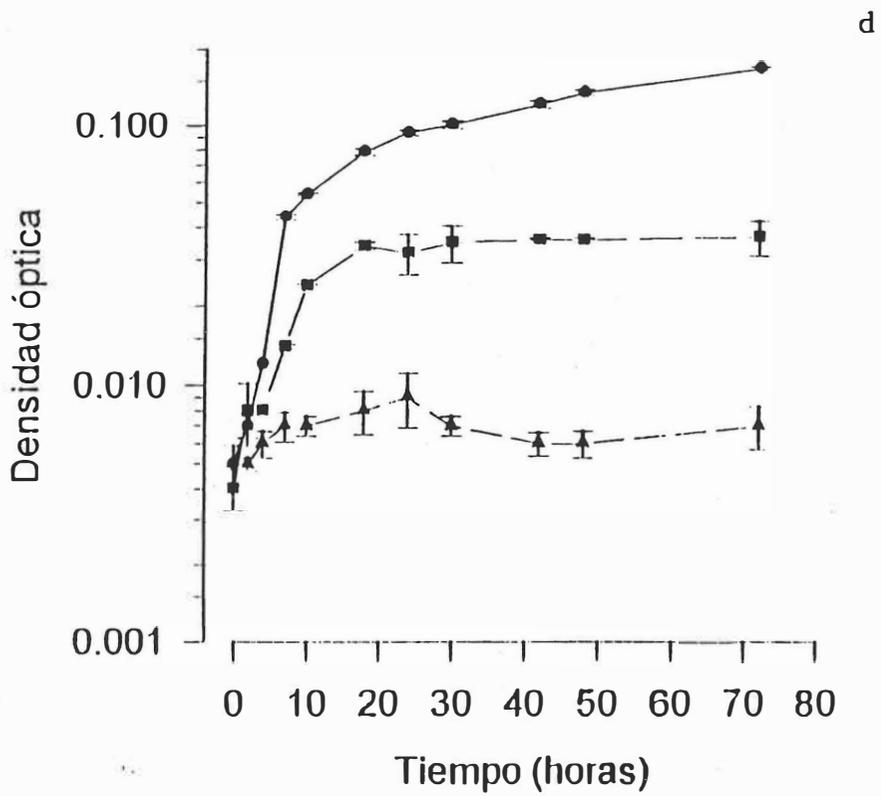
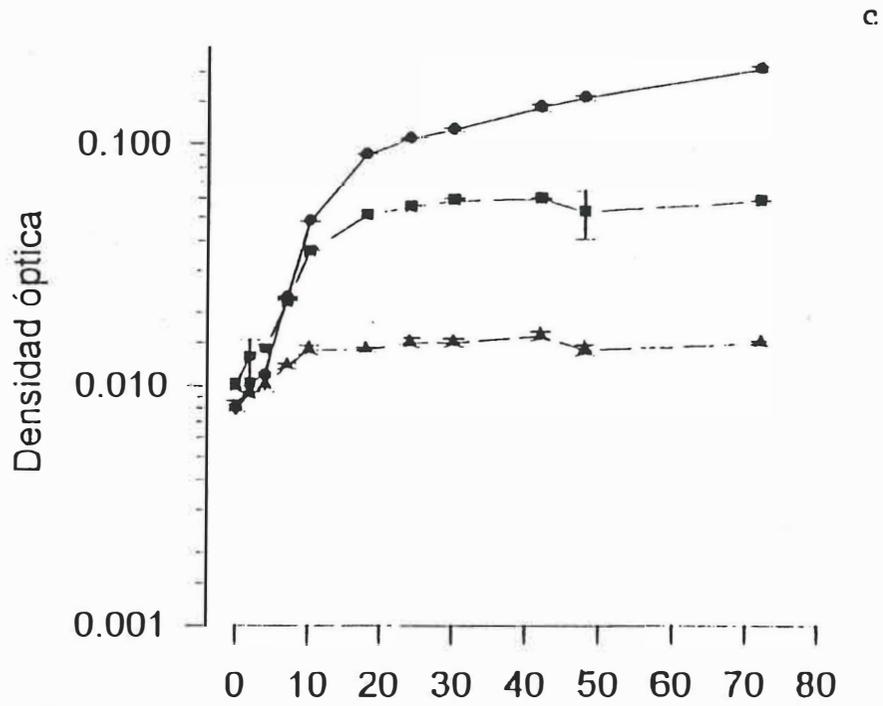
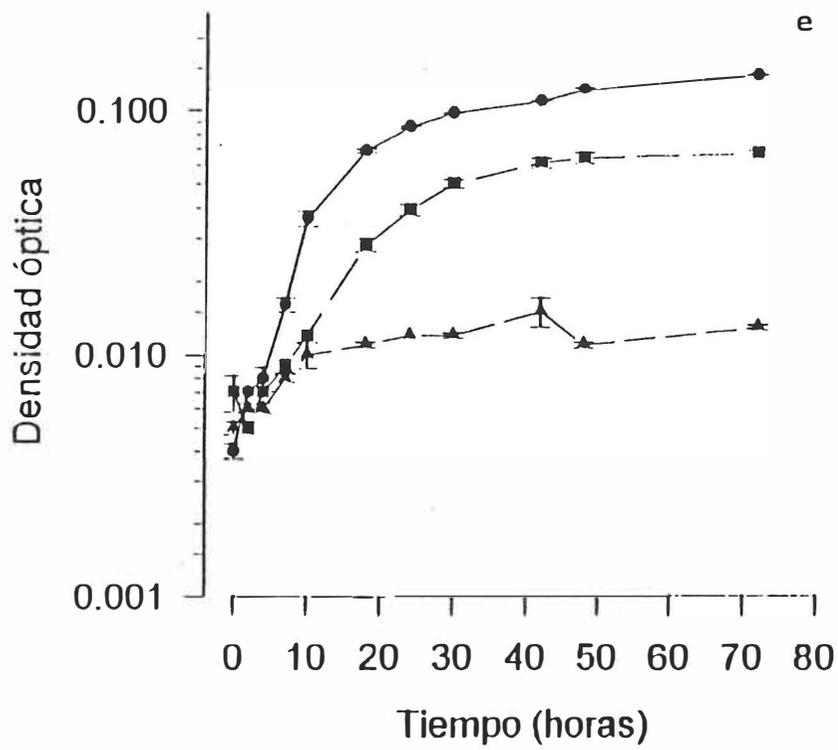


Figura 7. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas SK-01 a 05 a diferentes concentraciones de baptopeptona. (●) 0.1 %, (■) 0.01% y (▲) 0.001 %. a: SK-01, b: SK-02, c: SK-03, d: SK-04 y e: SK-05.



continuación figura 7



continuación figura 7

Tabla VIII. Características de crecimiento de las cepas bacterianas SK-01 a 05 a concentraciones decrecientes de bactopectona. Lag: tiempo necesario para el inicio de crecimiento. d.o.: densidad óptica a 550 nm. \* a 24 horas.

Variable	Conc. (%)	C E P A				
		SK-01	SK-02	SK-03	SK-04	SK-05
$\mu$ N° divisiones en 24 horas	0.1	2.39	3.54	3.73	4.24	4.41
	0.01	0.32	2.70	2.46	3.00	2.48
	0.001	0.0	0.0	0.91	0.85	1.27
N° horas para 1 <sup>era</sup> duplicación	0.1	20 (lag 16)	8 (lag 4)	5	4	4
	0.01	32 (lag 24)	24 (lag 16)	8	4	8 (lag 4)
	0.001	72 (lag 48)	N.C.	24	24	10
d.o. max. a 48 horas	0.1	0.042	0.046	0.158	0.136	0.122
	0.01	0.018	0.024	0.053	0.036	0.064
	0.001	0.005	0.01	0.014	0.009*	0.015*
N° cel. max.(10 <sup>6</sup> )	0.1	10.27	9.65	117.55	85.76	62.54
	0.01	2.80	3.06	34.05	10.79	24.64
	0.001	0.39	0.26	7.52	1.24	3.04

del crecimiento (lag), que se incrementó al disminuir la concentración de sustrato orgánico.

Las diferencias observadas en la velocidad de crecimiento también se reflejaron en la biomasa producida. Los valores de densidad óptica máxima obtenidos a las 48 horas, que se pueden usar como una medida de la biomasa bacteriana, disminuyeron con la concentración de sustrato orgánico. Los niveles de variación dependieron de la cepa. En general la biomasa producida con el 0.1 % de sustrato orgánico se redujo aproximadamente de un 50% en la concentración siguiente (0.01 %), aunque para SK-03 y SK-04 se llegó cerca del 30%. En la concentración más baja (0.001%) la disminución fue de casi un orden de magnitud y para el caso de SK-02 no hubo crecimiento.

Los resultados anteriores sugieren que en un ambiente limitado por nutrientes orgánicos, como los cultivos de *S. costatum*, las cepas SK-01 y SK-02 no podrían establecerse y competir exitosamente con especies que tienen las mismas características por lo que se refiere a sus exigencias de disponibilidad de sustrato. Las cepas SK-03 y SK-05 mostraron una mejor respuesta en la concentración de sustrato orgánico más baja. Por esta característica se les puede considerar como especies competitivas en ambientes limitantes, con mejores posibilidades de establecerse desde un inicio en los cultivos de *S. costatum*.

#### **III. 7. 4. Efecto de las cepas SK sobre el crecimiento de *Skeletonema costatum***

Este ensayo se realizó con la mezcla de las cepas SK-01 a SK-05 y con SK-02, SK-03 y SK-05 de manera separada o mezcladas entre sí. Estas últimas se estudiaron por separado porque en el ensayo con *Artemia franciscana* la sobrevivencia de *Artemia* resultó mejor con estas tres cepas. El número de células  $\text{ml}^{-1}$  de los cultivos de *Skeletonema* con bacterias en la fase de crecimiento lento fue comparado con el del control por medio de una prueba t de Student para el caso del ensayo con la mezcla de las cepas SK-01 a SK-05 y por medio de un ANOVA de una vía en los otros ensayos.

El crecimiento de *S. costatum* en el cultivo con la mezcla de las cinco cepas de bacterias no fue diferente al del control axénico (Fig. 8). Similarmente, aunque el número promedio de células  $\text{ml}^{-1}$  alcanzado en el control fue ligeramente menor al del cultivo mixto (Tabla IXa), las diferencias encontradas en los días 6 y 8 no fueron significativas ( $p=0.733$  y  $p=0.609$ , respectivamente).

En el caso de las cepas SK-02 y 03, la concentración final de *S. costatum* en condiciones axénicas fue significativamente mayor a la de los cultivos con bacterias (Tabla IXb). Además éstos fueron significativamente diferentes entre sí ( $p=0.017$ ) con  $\text{SK-03} > \text{mezcla} > \text{SK-02}$

En el tercer ensayo los cultivos tardaron más que los anteriores para alcanzar la fase de crecimiento lento, ya que la concentración celular inicial fue menor ( $40 \cdot 10^3 \text{ cel ml}^{-1}$ , comparada con  $78$  y  $95 \cdot 10^3 \text{ cel ml}^{-1}$  de los dos ensayos anteriores, respectivamente). Por este motivo este ensayo continuó hasta el día 9 y el número de células se registró para los días 5, 7 y 9.

Contrariamente a la prueba anterior, la exposición de *S. costatum* a la cepa SK-02 produjo valores de abundancia celular mayores al control (Tabla IXc). Este efecto positivo de SK-02 fue ligeramente mayor al que se observó con SK-05, aunque las diferencias observadas no fueron significativamente diferentes ( $p=0.376$ ). Esta tendencia se mantuvo en las tres fechas revisadas.

La falta de diferencia entre las curvas de crecimiento y las densidades celulares de *Skeletonema costatum*, cultivada en forma axénica o con la comunidad bacteriana con la cual coexiste normalmente en cultivo comprueba que, en las condiciones en las cuales se llevó a cabo este ensayo, no hay ninguna relación interespecífica que influya, positiva o negativamente, sobre el crecimiento de la microalga. En el caso de los cultivos mixtos con una sola cepa de bacterias, la presencia de SK-03 y de SK-05 aparentemente favorece el

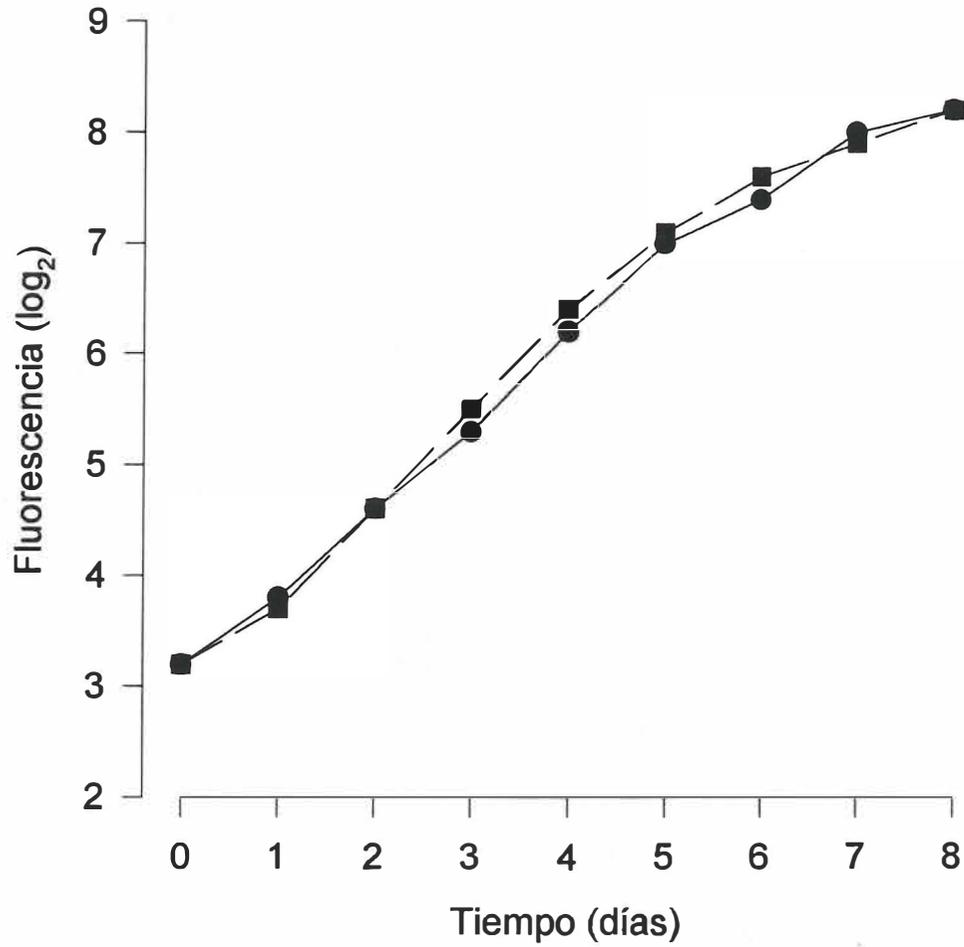


Figura 8. Crecimiento de *Skeletonema costatum* en cultivos axénicos ( ● ) y en cultivos mixtos con las cepas de bacterias SK-01 a 05 ( ■ ).

Tabla IX. Concentraciones promedio de *Skeletonema costatum* ( X: en número de células  $\times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) y límites de confianza (LC:  $p=0.05$ ) en cultivos mixtos con (a): mezcla de las cepas bacterianas SK-01 a 05; (b) cepas SK-02, SK-03 y mezcla de las dos y (c) cepas SK-02, SK-05 y mezcla de las dos. Día: día de muestreo.

(a)

Día	Control		Experimental	
	6	8	6	8
X	1.545	1.545	1.642	1.640
LC (inf)	0.770	1.075	0.803	1.093
LC (sup)	2.320	2.015	2.481	2.186

(b)

Día 5	Control	SK-02	SK-03	Mezcla
X	2.130	1.040	1.860	1.430
LC (inf)	1.241	-1.501	1.606	-0.730
LC (sup)	3.019	3.581	2.114	3.590

(c)

Día 5	Control	SK-02	SK-05	Mezcla
X	0.213	0.315	0.220	0.226
LC (inf)	0.111	0.074	0.055	-0.371
LC (sup)	0.315	0.556	0.385	0.823

Día 7	Control	SK-02	SK-05	Mezcla
X	0.532	0.923	0.750	0.692
LC (inf)	0.062	0.381	0.750	-2.192
LC (sup)	1.002	1.465	0.750	3.576

Día 9	Control	SK-02	SK-05	Mezcla
X	1.110	1.448	1.342	1.107
LC (inf)	-1.749	1.371	-0.653	-1.904
LC (sup)	3.969	1.525	3.337	4.118

crecimiento de *S. costatum*. Cuando éstas se usan en mezcla con SK-02 la acción bactericida de SK-02 disminuye significativamente el efecto de la primera mientras que su efecto, que es solamente de tipo bacteriostático en el caso de SK-05, hace menos notoria esta disminución.

Los resultados de los cultivos mixtos de *S. costatum* y SK-02 son contradictorios, con densidades celulares de la microalga inferiores y superiores que en el control en el primer y en el segundo experimento, respectivamente. El crecimiento de la microalga que, aún en los cultivos control, fue notablemente más lento durante el segundo experimento, indica diferencias en la condición inicial de los inóculos. Esto pudiera ser el motivo de esta discrepancia, sobre todo considerando que el menor crecimiento microalgal del segundo ensayo resultó muy probablemente en una baja concentración de sustrato. En vista de los requerimientos nutricionales de SK-02, esta limitación pudiera haber modificado el tipo y/o la concentración de las sustancias extracelulares producidas por esta cepa.

De las cinco bacterias aisladas de *S. costatum*, SK-05 fue la cepa seleccionada para usarse en los los ensayos de exclusión de *Vibrio* en cultivos mixtos. Su capacidad de reproducirse con relativa rapidez a bajas concentraciones de sustrato orgánico la hace una especie competitiva en ambientes limitantes, con mayores posibilidades de establecerse desde un inicio dentro de los cultivos de *S. costatum*. Aunque su tasa de crecimiento exponencial es menor a la de las dos especies de *Vibrio*, la larga duración del período de crecimiento lento le permite alcanzar concentraciones celulares finales iguales o mayores a las de *Vibrio* spp., con células que se mantienen libres en suspensión y que por eso actúan de manera uniforme dentro del cultivo. Las condiciones ambientales iniciales de un cultivo de *S. costatum* se pueden considerar limitantes para otras bacterias a causa de las bajas concentraciones de sustrato orgánico, y por lo tanto serían favorables para que SK-05 se establezca como especie dominante. La continua y eficiente utilización de sustrato de esta cepa no permitiría que los productos extracelulares de la microalga se acumulen en el medio e impediría de esta forma el establecimiento de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*.

Además, la presencia de SK-05 en cultivos de *S. costatum* no afecta a la microalga y parece más bien tener un efecto positivo sobre su crecimiento.

### III. 8. Exclusión de *Vibrio* en cultivos mixtos *Skeletonema costatum*-SK-05

Para este ensayo se usaron recipientes de plástico de 2 litros de capacidad con 1 litro de medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962). El inóculo de *Skeletonema costatum* a nivel Erlenmeyer fue preparado como en el inciso II.3., con las mismas condiciones de incubación.

Dieciocho horas después de adicionar el inóculo de SK-05, se conectó durante una hora el sistema de entrada de aire para burbujeo con la salida del aire de un cultivo de *V. alginolyticus*, en fase de crecimiento exponencial, con el fin de exponer los cultivos de *S. costatum* a una fuente exógena importante de contaminación bacteriana. Como control se usó un cultivo de *S. costatum* no bacterizado con SK-05.

Veinticuatro horas después de la exposición a *V. alginolyticus* se tomaron muestras de cada uno de los recipientes (experimentales y controles), que se inocularon en placas de agar Zobell y se observaron al microscopio de epifluorescencia, usando el método de tinción con anaranjado de acridina (Daley y Hobbie, 1975).

Este ensayo se realizó dos veces; en cada una de ellas los cultivos de *S. costatum* (experimental y control) se hicieron por triplicado. En el primer ensayo la evaluación de la concentración de *V. alginolyticus* se hizo en cada uno de los tres cultivos mientras que en el segundo uno de los cultivos de cada tipo se utilizó en su totalidad para analizar la calidad de la biomasa producida.

Los resultados de los cultivos en placa, al igual que las observaciones directas con el microscopio de epifluorescencia, demostraron una dominancia de *Vibrio* en los cultivos de *Skeletonema* no protegidos con SK-05. En los preinoculados con esta cepa, por otro lado, la

concentración final de *V. alginolyticus* fue de un orden de magnitud inferior y representó como máximo el 5% del total de las bacterias presentes (Tabla X).

Es interesante hacer notar que en los controles, aparte de *Vibrio alginolyticus*, se encontró en ambos ensayos una concentración relativamente elevada de otras bacterias. Entre éstas, SK-05 representó el 25 y el 31% de las bacterias totales. Independientemente del origen de estas bacterias (filtración de aire insuficiente o presencia de formas antibiótico-resistentes en los cultivos de *Skeletonema* al tiempo de la axenización), la presencia e importancia de SK-05, que en ambos casos alcanzó concentraciones cercanas al 50% de las de *Vibrio alginolyticus*, demuestra una vez más la competitividad de esta cepa. Esto confirma la posibilidad de utilizarla para el control biológico de *Vibrio alginolyticus* y probablemente, en vista de su menor velocidad de crecimiento y de las bajas concentraciones que alcanza aún en cultivos monoespecíficos, de *V. parahaemolyticus*.

### III. 9. Optimización de extracción de proteínas bacterianas y composición proximal de cultivos mixtos *Skeletonema costatum* +SK-05

De acuerdo a las condiciones ensayadas para la extracción de proteínas en los cultivos de las bacterias SK-02 y SK-05, la exposición a 100° C de temperatura durante 100 minutos con NaOH 1.0 N produjo los porcentajes de extracción mayores (  $p= 0.007$ ; Tabla XI). El tratamiento de sonicado por 4 minutos incrementó los porcentajes de extracción en SK-02 ( $p= 0.01$ ) mientras que para SK-05 este tratamiento no fue necesario y hasta disminuyó significativamente ( $p = 0.007$ ) los porcentajes de extracción.

Este efecto negativo del ultrasonido ha sido descrito, aunque con tiempos más largos, por Rivera Padilla (1993) quien por otro lado utilizó un material notoriamente más refractario (lodos activados). La explicación más probable de este efecto es la doble acción del ultrasonido, que causa la formación de microburbujas que, al imploder, generan una intensa actividad cinética de las moléculas y partículas presentes en solución y en

Tabla X. Concentración promedio de bacterias (en unidades formadoras de colonias  $\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) y límites de confianza (LC:  $p=0.05$ ) en cultivos de *Skeletonema costatum* axénico (control) y precolonizados con la cepa bacteriana SK-05, 48 horas después de su contaminación exógena con cultivos de *Vibrio alginolyticus* (V.A.), en dos ensayos diferentes. En paréntesis % del total de bacterias.

### Primer ensayo

	Control				Experimental			
	SK-05	VA	Otras	Total	SK-05	VA	Otras	Total
X (% total)	0.398 ( 25 )	0.665 ( 42 )	0.520 ( 33 )	1.583	1.633 ( 98 )	0.040 ( 2 )	---	1.674
LC (inf)	0.209	0.407	0.012		0.635	0.036	---	
LC (sup)	0.587	0.923	1.028		2.661	0.044		

### Segundo ensayo

	Control				Experimental			
	SK-05	VA	Otras	Total	SK-05	VA	Otras	Total
X (% total)	0.305 (31)	0.687 ( 69 )	---	0.992	1.700 ( 95 )	0.091 ( 5 )	---	1.791
LC (inf)	-0.203	-0.164	---		-6.559	-0.646	---	
LC (sup)	0.813	1.538			9.959	0.828		

Tabla XI. Porcentajes de proteína obtenidos en muestras de las cepas de bacterias SK-02 y SK-05 sometidas a diferentes condiciones de extracción. Normalidad de NaOH (0.5 y 1.0) y exposición (con) o no (sin) a ultrasonido.

	C	E	P	A
	SK-02		SK-05	
Ultra-sonido	Normalidad de NaOH			
	0.5	1.0	0.5	1.0
Con	23.33	28.57	14.46	28.79
	18.84	36.05	7.67	28.04
	18.84	37.55	10.69	28.04
Sin	11.35	28.56	39.74	34.83
	15.85	31.56	21.62	32.95
	10.60	27.07	23.52	31.81

suspensión, liberando además una alta cantidad de energía térmica. La combinación de estos efectos ha sido relativamente bien estudiada en sistemas no biológicos, pero aún no es bien comprendida en sistemas acuosos con moléculas o partículas de origen biológico (Suslick, 1989 y Suslick, 1990). El efecto más evidente es la formación de peróxido y de otros compuestos radicales fuertemente oxidantes, que pudieran causar la desnaturalización del material biológico presente (en el caso específico, deaminación de los aminoácidos protéicos), aunque no se puede descartar, como resultados de la alta energía cinética del sistema, la formación de agregados o de macromoléculas, posiblemente más refractarias a la acción de los agentes extractivos.

Por lo anterior, se decidió no utilizar pretratamiento con ultrasonido en los cultivos mixtos con *S. costatum*, en los cuales el uso de NaOH 1.0 N produjo porcentajes de extracción promedio ligeramente más altos ( $37.65 \pm 1.55$  e.e.) que los obtenidos con NaOH 0.2 N ( $35.27 \pm 1.41$  e.e.), normalidad óptima para cultivos axénicos de *S. costatum* (López Elías Com. pers.) o cuando la componente bacteriana no es considerada (Tabla XII).

### III. 10. Cultivos mixtos *Skeletonema costatum*-bacterias como alimento para *Artemia franciscana*

Los nauplios de *Artemia franciscana* se obtuvieron de quistes comerciales descapsulados por el método de hipoclorito de acuerdo a Correa Sandoval (1991). Una vez que emergieron, los nauplios se lavaron con una solución de mertiolate (0.05 %) y se transfirieron a recipientes de plástico de dos litros con un litro de agua de mar filtrada a  $0.2 \mu\text{m}$  que se mantuvieron a  $25^\circ\text{C}$  en un baño maría. La densidad inicial fue de  $150$  nauplios  $\text{l}^{-1}$ . Los cultivos se mantuvieron con aereación continua y cada tercer día se cambió la mitad del volumen de agua de mar.

Los cultivos de *S. costatum* necesarios para alimentar los nauplios se prepararon como en los ensayos anteriores, con las mismas condiciones de inóculo, de cultivo y de

Tabla XII. Composición química bruta en % de peso seco de *Skeletonema costatum* en cultivos axénicos (sin bacterias) y cultivos mixtos con la cepa bacteriana SK-05, en fases de crecimiento lento y estacionaria (estac.). En paréntesis se presenta el valor del error estándar. n= 5. \* La normalidad del NaOH usado en este caso fue de 1.0, el óptimo para bacterias.

Condición	fase crecim.	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas	Peso seco ( $\mu\text{g}$ ) de $10^6$ cels
Sin bacterias	lento	37.28 ( 0.98 )	31.16	4.56 ( 0.12 )	27	69.56
	estac.	45.79 ( 0.61 )	29.6	8.61 ( 1.03 )	16	69.13
	estac.	43.34 ( 0.62 )	20.75	12.91 ( 0.84 )	23	41.25
Con SK-05	estac.	35.27 ( 1.41 )	22.86	12.87 ( 0.59 )	29	46.05
		37.65 * ( 1.55 )	20.48	"	"	

enriquecimiento con la cepa SK-05, que se agregó al cultivo en una concentración equivalente a  $10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}$ .

Los cultivos se mantuvieron con la técnica de cultivo semicontinuo con dilución diaria del 30%, por lo cual se pueden considerar en una fase de crecimiento cercana a la estacionaria. La cosecha se usó para proporcionar diariamente una ración equivalente, en peso seco, a la de la diatomea *Chaetoceros* sp. usada por Correa Sandoval (1991). De acuerdo al peso seco celular de *S. costatum*, que es aproximadamente el doble del reportado para *Chaetoceros* (López-Elías y Voltolina, 1993), se usó la mitad de las concentraciones celulares recomendadas cuando se usa esta última, determinando la concentración de *S. costatum* por medio de un hematocitómetro.

El efecto del cultivo mixto *S. costatum*+SK-05 como alimento para *A. franciscana* se determinó considerando los valores de sobrevivencia y de crecimiento en talla.

Los tratamientos experimentales (nauplios alimentados con el cultivo mixto *S. costatum*+SK-05), así como los controles, que consistieron en cultivos de nauplios sin alimento y en otros alimentados con *S. costatum* axénico, se realizaron por triplicado.

Al inicio del ensayo se tomó una muestra de nauplios que se fijaron con formol al 4 %, modificando el pH de la solución con glicerofosfato de sodio hasta obtener valores de pH 8 (Correa Sandoval, 1991), que se midieron posteriormente para tener el tamaño promedio inicial.

Al séptimo día de cultivo los organismos restantes en cada recipiente fueron contados para calcular los porcentajes de sobrevivencia, y medidos para obtener el tamaño promedio alcanzado al final del ensayo.

La concentración inicial de bacterias ( $10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) fue baja, pero fue aparentemente suficiente para modificar el contenido proteínico de la dieta, que resultó entre un 6 y un 8%

inferior para el cultivo bacterizado (Tabla XII). Esta diferencia, que alcanza marginalmente los niveles de significancia (  $p > 0.1$  ), no afectó en forma evidente el crecimiento y la sobrevivencia de *A. franciscana*.

Las tallas promedio al séptimo día, al igual que los valores de sobrevivencia de los nauplios en los diferentes tratamientos transformados como  $\arccos(\sqrt{\% \text{ sobrevivencia}})$  se compararon por medio de una prueba t de Student (Sokal y Rohlf, 1981), con la cual se demostró que los valores de sobrevivencia y de crecimiento de *A. franciscana* alimentada durante siete días con cultivos de *S. costatum* axénicos o mixtos con la bacteria SK-05 no difirieron significativamente (Tabla XIII). En el tratamiento sin alimento la sobrevivencia fue del 0 % y los datos no se incluyen por consiguiente en la tabla.

Tabla XIII. Supervivencia (%) y crecimiento ( en  $\mu\text{m}$  ) promedios de *Artemia franciscana* alimentada con cultivos de *Skeletonema costatum* axénica (control) y *S. costatum* mixta con la cepa bacteriana SK-05. Se presentan además los valores de tamaño inicial y final promedios usados para calcular el crecimiento. LC: límites de confianza. Signif.: significancia de la prueba t de Student. NS: no significativo.\*número total de organismos medidos.

	Supervivencia (%)		Tamaño ( $\mu\text{m}$ )			Crecimiento ( $\mu\text{m}$ )	
	Control	Con SK-05	Inicial	Final		Control	Con SK-05
				Control	Con SK-05		
X	46	38	804.64	1553.62	1662.51	748.98	857.87
LC (inf)	3	12	764.92	1395.27	1405.15	590.63	600.51
LC (sup)	89	64	844.36	1711.97	1919.87	907.33	1115.23
Signif.	p = 0.569; NS					p = 0.196; NS	
			(40*)	3(172*)	3(121*)		

#### IV. CONCLUSIONES

Las sustancias extracelulares producidas por *Skeletonema costatum* no son suficientes y hasta pueden inhibir el crecimiento de bacterias de colección, aisladas por su capacidad de producir vitamina B<sub>12</sub>. En el caso de las cepas que pueden crecer utilizando estas sustancias, sería necesario agregar un sustrato orgánico adicional, para que su crecimiento sea lo suficientemente rápido para poder excluir bacterias indeseables.

Se determinó que la mayor parte de las bacterias usadas para este estudio e inicialmente descritas como productoras de vitamina B<sub>12</sub> utilizan preferentemente el mismo sustrato orgánico que favorece el crecimiento de gran parte de las especies del género *Vibrio*. Además, la mayoría de estas cepas han perdido la facultad de producir, por lo menos extracelularmente, vitamina B<sub>12</sub>, sustancia que además de favorecer el crecimiento de *S. costatum* mejoraría la calidad dietética del cultivo mixto microalga-bacterias.

Con base en todo esto se decidió utilizar bacterias cuya coexistencia con *S. costatum* estuviera comprobada, aislando las bacterias presentes en cultivos no axénicos de esta microalga.

Se determinó que, bajo las condiciones de cultivo utilizadas en el presente estudio, *S. costatum* presenta una comunidad bacteriana formada exclusiva y consistentemente por cinco cepas, dos de las cuales (SK-01 y 02) presentan características cercanas al género *Vibrio*, una (SK-03) al género *Flavobacterium* y las dos restantes (SK-04 y 05) a los géneros *Plesiomonas* y *Aeromonas*, respectivamente. Estas cepas, a parte de coexistir con *S. costatum*, no afectan el crecimiento de la microalga. Por otro lado se determinó que las dos cepas de crecimiento más lento (SK-01 y 02) tienen efectos antibióticos o bacteriostáticos contra dos de las otras cepas (SK-03 y 05) que son más competitivas, por lo que se refiere a utilización de sustrato en bajas concentraciones, análogas a las condiciones que pueden encontrar en las primeras fases de un cultivo de *S. costatum*.

Ensayos adicionales demostraron que ninguna de estas bacterias es patógena para *Artemia franciscana*, que se usó para el bioensayo de alimentación con cultivos mixtos. Los resultados de estos ensayos indican además que *A. franciscana* puede utilizar algunas de estas bacterias como fuente de alimento.

Pruebas de coexistencia *in vitro* demostraron que una de estas cepas (SK-05) puede coexistir con dos de las especies del género *Vibrio* (*V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*) cuya patogenicidad para varios invertebrados marinos está bien fundamentada en la literatura científica.

En cultivos de *S. costatum* inoculados con la cepa SK-05 y expuestos posteriormente a *V. alginolyticus*, la cepa patógena no pudo establecerse exitosamente ya que su concentración representó un porcentaje insignificante de la concentración bacteriana total.

Los resultados de las pruebas de coexistencia *in vitro* demuestran que la acción protectora de SK-05 no se debe a un efecto de antibiosis sino a un proceso de exclusión competitiva. Esta cepa utiliza rápidamente el escaso sustrato orgánico disponible en los cultivos de *Skeletonema costatum*, no permitiendo de esta forma el crecimiento de *V. alginolyticus*.

El uso de un cultivo mixto de *S. costatum* con la cepa bacteriana SK-05, como dieta para *A. franciscana*, no afecta el crecimiento ni la sobrevivencia de *Artemia* aunque tampoco se notan efectos positivos en comparación con los obtenidos con el cultivo axénico. Esto se debe a que la biomasa bacteriana presente en el cultivo no es suficiente para modificar cuantitativamente la composición de la dieta, aunque hay una ligera disminución de su contenido de proteínas.

El uso de un cultivo mixto microalgas con una cepa bacteriana de características conocidas, como el establecido entre *S. costatum* y SK-05, es de utilidad para el control biológico de especies no deseadas.

Los resultados de esta investigación muestran la necesidad de realizar estudios en las siguientes direcciones:

Conocer la complejidad de las relaciones existentes entre las bacterias presentes en los cultivos comerciales.

Seleccionar otras cepas de bacterias que resulten eficientes como alimento y a la vez como control de las cepas patógenas.

Ampliar este tipo de estudios para el control de otros organismos patógenos.

Establecer una metodología para el uso de probióticos a fin de dar bases en este campo y reducir la práctica empírica que, aunque en general da resultados favorables, no asegura su repetibilidad.

**LITERATURA CITADA**

- Amouroux, J.M. 1986. Comparative study of the carbon cycle in *Venus verrucosa* fed on bacteria and phytoplankton. I. Consumption of bacteria (*Lactobacillus* sp.). *Mar. Biol.* 90: 237-241.
- Aldana Godínez, A.V. 1989. Producción de B<sub>12</sub> por bacterias marinas degradadoras de petróleo crudo. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Austin, B. 1988. *Marine Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Azam, F. 1984. The ecological and biogeochemical roles of the bacterioplankton in coastal marine ecosystems, p. 317-326. En: *Marine geology and oceanography of Arabian Sea and coastal Pakistan*. (B.U. Haq y J.D. Milliman, eds). Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Azam, F., T. Fenchel, J.C. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-Reil y F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10:257-263.
- Bell, W. y R. Mitchell. 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol. Bull.* 143:265-277.
- Berland, B.R., M.C. Bianchi y S.Y. Maestrini. 1969. Etude des bactéries associés aux algues marines en culture. *Mar. Biol.* 2:350-355.
- Berland, B.R., D.J. Bonin y S.Y. Maestrini. 1970. Study of bacteria associated with marine algae in culture. III. Organic substrates supporting growth. *Mar. Biol.* 5:68-76.
- Berland, B.R., D.J. Bonin y S.Y. Maestrini. 1972a. Etude des relations algues-bactéries du milieu marin: possibilité d'inhibition des algues par les bactéries. *Tethys* 4(2):339-348.
- Berland, B.R., D.J. Bonin y S.Y. Maestrini. 1972b. Are some bacteria toxic for marine algae. *Mar. Biol.* 12:189-193.
- Bianchi, M. 1976. Étude taxonomique et distribution écologique des bactéries Vibrioides du milieu marin. These de Doctorat. L'Université D'Aix-Marseille II., Francia.
- Bligh, E.G. y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.

- Brock, T.D. y M.T. Madigan. 1991. *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall, New Jersey.
- Brown, C. 1973. The effects of some selected bacteria on embryos and larvae of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* 21:215-223.
- Brown, M.R., C.D. Garland, S.W. Jeffrey, I.D. Jameson y J.M. Leroi. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *J. appl. Phycol.* 5:285-296.
- Capone, D.G. y J.E. Bauer. 1992. Microbial processes in coastal pollution, 191-237. En: *Environmental Microbiology* (R. Mitchell, ed.). Wiley-Liss, Inc., New York.
- Carlucci, A.F. y P.M. Bowes. 1970a. Production of vitamin B<sub>12</sub>, thiamine and biotin by phytoplankton. *J. Phycol.* 6:351-357.
- Carlucci, A.F. y P.M. Bowes. 1970b. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture. *J. Phycol.* 6:393-400.
- Chalermwat, K., T.R. Jacobsen y R.A. Lutz. 1991. Assimilation of bacteria by the dwarf surf clam *Mulinia lateralis* (Bivalvia: Mactridae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71:27-35.
- Chiaverini, J. 1972. *Techniques d'extraction et d'analyse des lipides*. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 12. 12 pp.
- Chu, F.E., J.L. Dupuy y K.L. Webb. 1982. Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 29:241-252.
- Cole, J.J. 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13:291-314.
- Correa Sandoval, F. 1991. Caracterización biológica y bioquímica de algunas poblaciones de *Artemia franciscana* Kellog, 1906. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México.
- Costa-Pierce, B.A. y D.B. Craven. 1987. Estimating microbial production and growth rates in aquaculture ponds using rates of RNA and DNA synthesis. *Aquaculture* 66:69-78.
- Crisóstomo Vázquez, L. 1992. Liofilización de la bacteria marina I-2 y su posible utilización como control biológico del hongo *Lagenidium callinectes*. Tesis de Maestría en

Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México.

- D'Agostino, A. 1975. Antibiotics in cultures of invertebrates, p. 109-133. En: Culture of marine invertebrate animals (W.L. Smith y M.H. Chanley, eds.). Plenum Press., New York.
- Daley, R.J. y J.E. Hobbie. 1975. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceanogr.* 20:875-882.
- Davis, H.C. y R.R.L. Guillard. 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as food for oyster and clam larvae. *Fish. Bull.* 136:292-304.
- De Lucca, R. y M.D. Mc Cracken. 1977. Observations on interactions between naturally-collected bacteria and several species of algae. *Hydrobiologia* 55:71-75.
- De Pauw, N. y G. Persoone. 1988. Micro-algae for aquaculture, p. 197-221. En: Micro-algal biotechnology (M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka, eds). Cambridge University Press.
- Dorsey, T.E., P. Macdonald y O.A. Roebbs. 1978. Measurements of phytoplankton-protein content with the heated Biuret-Folin assay. *J. Phycol.* 14:167-171.
- Douillet, P. y C.J. Langdon. 1993. Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *Biol. Bull.* 184:36-51.
- Douillet, P. y C.J. Langdon. 1994. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 119:25-40.
- Droop, M.R. 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *Br. Phycol. Bull.* 3:295-297.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Ducklow, H.W. 1984. Geographical ecology of marine bacteria: Physical and biological variability at the mesoscale, p. 22-31. En: Current perspectives in microbial ecology, (M.J. Klug y C.A. Ready, eds). American Society for Microbiology., Washington.

- Epifanio, C.E. 1979. Growth in bivalve molluscs: nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture* 18:1-12.
- Fábregas, J. y M. Veiga. 1984. Effect of extracellular and endocellular products from the marine microalgae *Tetraselmis suecica* and *Navicula laevissima* on the growth of four marine bacteria. *Rev. Int. Océanogr. Med.* LXXV-LXXVI:59-64.
- Farber Lorda, J. 1986. Etudes biologiques, energetiques et biochimiques du krill antarctique *Euphasia superba* et *Thysanoessa macrura* recolté au cours de la Campagne FIBEX. These de Doctorat, Université de Aix-Marseille II., Francia.
- Fernández-Reiriz, M.J., A. Perez-Camacho, M.J. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M.J. Campos y V. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83:17-37.
- Fogg, G.E. 1966. The extracellular products of algae. *Oceanog. Mar. Biol. Ann. Rev.* 4:195-212.
- Gauthier, M., Y. Martin, P. Lelong y V. Breittmayer. 1986. Interactions entre les bactéries et les algues dans un culture continue de phytoplancton naturel soumise aux conditions extérieures. Deuxième Colloque International de Bactériologie Marine. Actes de Coloques 3:361-373.
- Gil Turnes, S. 1988. Antimicrobial metabolites produced by epibiotic bacteria: their role in microbial competition and host defense. Ph. D. Thesis. University of California, San Diego.
- Gil Turnes, S., M.E. Hay y W. Fenical. 1989. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science* 246:116-117.
- Guillard, R.R.L. 1968. A simplified antibiotic treatment for obtaining axenic cultures of marine phytoplankton. Marine Biological Laboratory, Woods Hole Oceanographic Institution. Int. Ms.
- Guillard, R.R.L. 1973. Methods for microflagellates and nannoplankton, p.69-85. En: Handbook of phycological methods . Culture methods and growth measurements (J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.

- Guillard, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8:229-239.
- Guillard, R.R.L. y V. Cassie. 1963. Minimum cyanocobalamin requirements of some marine centric diatoms. Limnol. Oceanog. 8:161-165.
- Gunther, D.C. y A. Catena. 1980. The interaction of *Vibrio* with *Artemia* nauplii, p. 213-221. En: The brine shrimp *Artemia* Vol 1. Morphology, genetics, radiobiology, toxicology (G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels y E. Jaspers, eds). Universa Press. Wetteren, Belgium.
- Haines, K. C. 1974. Isolation of vitamin B<sub>12</sub>-producing bacteria on bioassay agar plates containing vitamin B<sub>12</sub>-requiring marine centric diatoms. J. Phycol. 10:367-368.
- Haines, K.C. y R.R.L. Guillard. 1974. Growth of vitamin B<sub>12</sub>-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B<sub>12</sub>-producing marine bacteria. J. Phycol. 10:245-252.
- Haven, D.S. y R. Morales-Alamo. 1970. Filtration of particles from suspension by the american oyster *Crassostrea virginica*. Biol. Bull. 139:248-264.
- Heinle, D.R., D.A. Flemer, J.F. Ustach, R.A. Murtagh y J.A. Mihursky. 1972. The role of organic debris and associated microorganisms in pelagic estuarine food chains. Technical Report 14. University of Maryland. Natural Resources Institute. Chesapeake Biological Laboratory. Solomons Maryland 20688.
- Hellebust, J.A. 1974. Extracellular products, p. 838-863. En: Handbook of phycological methods. Physiology and biochemistry (W.D.P. Stewart, ed.). B.H. Blackwell, Oxford.
- Hoshaw, R.W. y J.R. Rosowski. 1973. Methods for microscopic algae, p 53-67. En: Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements, (J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Intriago, P. y D.A. Jones. 1993. Bacteria as food for *Artemia*. Aquaculture 113:115-127.
- Iturriaga, R. y A. Zsolnay. 1981. Transformation of some dissolved organic compounds by a natural heterotrophic population. Mar. Biol. 62:125-129.
- Johnston, R. 1936. Seawater, the natural medium of phytoplankton I. General features. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 43:247-256.

- Jorgensen, R. 1984. Effect of grazing: metazoan suspension feeders, p. 445-464. En: Heterotrophic activity in the sea (J.E. Hobbie y P.J. LeB. Williams, eds). Plenum Press., New York. Nato Conference Series IV:15.
- Kellam, S.J. y J. M. Walker. 1989. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *Br. phycol. J.* 24:191-194.
- Kellam, S.J., R.J.P. Cannell, A.M. Owsianka y J.M. Walker. 1988. Results of a large-scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. *Br. phycol. J.* 23:45-47.
- Kogure, K., U. Simidu y N. Taga. 1979. Effect of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve on the growth of marine bacteria. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 36:201-215.
- Kogure, K., U. Simidu y N. Taga. 1982. Bacterial attachment to phytoplankton in sea water. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 56:197-204.
- Langdon, C.J. y R.I.E. Newell. 1990. Utilization of detritus and bacteria as food sources by two bivalve suspension-feeders, the oyster *Crassostrea virginica* and the mussel *Geukensia demissa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58:299-310.
- Larsson, U. y A. Hagstrom. 1979. Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria. *Mar. Biol.* 52:199-206.
- Le Pennec, M. y D. Prieur. 1977. Les antibiotiques dans les elevages de larves de bivalves marins. *Aquaculture* 12:15-30.
- Lewin, J.C. y R.A. Lewin. 1960. Auxotrophy and heterotrophy in marine littoral diatoms. *Can. J. Microbiol.* 6:127-134.
- Liao, I.C., H.M. Su y H.H. Lin. 1983. Larval foods for penaeid prawns, p.43-69. En: CRC Handbook of mariculture. Crustacean aquaculture (J.P. Mcvey, ed.). CRC Press, Boca Raton.
- Loosanoff, U.L. y H.C. Davis. 1963. Rearing of bivalve mollusks. En: *Advances in marine biology*. Vol 1. ( F.S. Russell, ed.). Academic Press London.
- López-Elías, J.A. y D. Voltolina. 1993. Cultivos semicontinuos de cuatro especies de microalgas con un medio no convencional. *Ciencias Marinas, México.* 19:169-180.

- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- McLachlan, J. 1973. Growth media-marine, p. 25-51. En: *Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth measurements* ( J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Maeda, M. y K. Nogami. 1989. Some aspects of the biocontrolling method in aquaculture, p. 395-398. En: *Current topics in marine biotechnology* (S. Miyachi, I. Karube e Y. Ishida, eds.). Japanese Society of Marine Biotechnology., Tokio.
- Malara, G. y R. Charra. 1972. Dosage des glucides particulaires de phytoplancton selon la méthode de Dubois. Université de Paris. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail. No. 6. 12 pp.
- Mayzaud, P., J. Farber Lorda y M.C. Corre. 1985. Aspects of the nutritional metabolism of two antarctic euphausiids: *Euphausia superba* and *Thysanoessa macrura*. En: *Antarctic nutrient cycles and food webs* (W.R. Siegfried, R.R. Condy y R.M. Laws, eds.). Proc. 4<sup>th</sup> SCAR Symp. Antarct. Biol. Springer Verlag, Berlin.
- Mock, C.R. y R.A. Neal. 1974. Penaeid shrimp hatchery systems, p.9. En: *Proceeding of the FAO CARPAS symposium of aquaculture in Latin America* ( M. Mistakidis, ed.). Vol. 29.
- Moller, J.L. 1983. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight composition, and bacterial assimilation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11:39-48.
- Moriarty, D.J.W. 1976. Quantitative studies on bacteria and algae in the food of the mullet *Mugil cephalus* L. and the prawn *Metapenaeus bennettiae* (Racek & Dall). *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 22:131-143.
- Moriarty, D.J.W. 1977. Quantification of carbon, nitrogen and bacterial biomass in the food of some penaeid prawns. *Aust. J. mar. Fresh. Res.* 113-118.
- Murchelano, R.A. y C. Brown. 1969. Bacterial flora of some algal foods used for rearing bivalve larvae. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 26:2760-2764.
- Murchelano, R.A. y J. Bishop. 1975. Quantitative and qualitative studies of bacteria isolated from seawater used in the laboratory culture of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* 32:739-745.

- Muroga, K., K. Susuki, N. Ishibashi y K. Nogami. 1989. A vibriosis occurring in zoeal larvae of swimming crab *Portunus trituberculatus*. The Suisanzoshoku 37:133-141.
- Myklestad, S. 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. J. exp. mar. Biol. Ecol. 15:261-274.
- Myklestad, S. 1977. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. J. exp. mar. Biol. Ecol. 29:161-179.
- Nagata, T. 1986. Carbon and Nitrogen content of natural planktonic bacteria. Appl. environ. Microbiol. 52:28-32.
- Nalewajko, C. 1977. Extracellular release in freshwater algae and bacteria: extracellular products of algae as a source of carbon for heterotrophs. Chap. 18. En: Aquatic microbial communities (Jr. J. Cairns, ed.). Garland Publishing Inc. New York.
- Nalewajko, C., K. Lee y P. Fay. 1980. Significance of algal extracellular products to bacteria in lakes and in cultures. Microb. Ecol. 6:199-207.
- Nalewajko, C., T.G. Dunstall y H. Shear. 1976. Kinetics of extracellular release in axenic algae and in mixed algae bacteria cultures: significance in estimation of total (gross) phytoplankton excretion rates. J. Phycol. 12:1-5.
- Nascimento, I. A. 1977. Growth of the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg, fed with different algal species at high cell concentrations. J. Cons. Int. Explor. Mer 39(2):134-139.
- Nogami, K. y M. Maeda. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49:2373-2376.
- Okauchi, M. y Y. Hirano. 1986. Nutritional value of *Tetraselmis tetrathele* for larvae of *Penaeus japonicus*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 9:29-33.
- Oppenheimer, C.K. y C.E. Zobell. 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hidrostatic pressure. J. mar. Res. 11:10-18.

- Paasche, E. 1977. Growth of three plankton diatom species in Oslofjord water in the absence of artificial chelators. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 29:91-106.
- Pande, S.V., R.P. Khan y T.A. Venkitasubramanian. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acid. *Analyt. Biochem.* 6:415-423.
- Parker, M. 1977. Vitamin B<sub>12</sub> in Lake Washington, USA: concentration and rate of uptake. *Limnol. Oceanogr.* 22:527-538.
- Parsons, T.R., Y. Maita y C.M. Lalli. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press., Oxford. 173 pp.
- Parsons, T.R., K. Stephens y J.D.H. Strickland. 1961. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 18:1001-1016.
- Porras-Aguirre, J. 1984. Bacterias hidrocarbonoclasticas del tracto intestinal de los peneidos: *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum* y *Penaeus setiferus*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Provasoli, L. y A.F. Carlucci. 1974. Vitamins and growth regulators. Chap. 27. En: *Algal physiology and biochemistry*, ( W.D. Stewart, ed.). University of California Press.
- Raymont, J.E.G. 1963. Plankton and productivity in the oceans. Pergamon Press, Oxford.
- Rico-Mora, R. y D. Voltolina. 1995. Bacterial interactions in *Skeletonema costatum* Cleve (Bacillariophyceae) cultures. *Rivista Italiana di Acquacoltura* ---.
- Rico-Mora, R. y D. Voltolina. 1995. Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. *J. Invert. Pathol.* 66:---.
- Riisgard, H.U. 1983. Efficiency of particle retention and filtration rate in 6 species of Northeast american bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45:217 -223.
- Riquelme, C.E., K. Fukami e Y. Ishida. 1989. Growth response of bacteria to extracellular products of bloom algae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:349-355.
- Rivera Padilla, M.A. 1993. Métodos de preparación y técnicas de análisis de los lodos activados. Trabajo de Investigación. Escuela de Ingeniería Bioquímica en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tijuana, México.

- Romberger, H. P. y C.E. Epifanio. 1981. Comparative effects of diets consisting of one or two algal species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquaculture* 25:77-87.
- Russell-Hunter, W.D. 1970. *Aquatic productivity*. McMillan, London.
- Schleyer, M.H. 1981. Microorganisms and detritus in the water column of a subtidal reef of natal. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 4:307-320.
- Seiderer, L. J., C.L. Davis, F.T. Robb y R.C. Newell. 1984. Utilisation of bacteria as nitrogen resource by kelp-bed mussel *Choromytilus meridionalis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 15:109-116.
- Seiderer, L.J. y R.C. Newell. 1985. Relative significance of phytoplankton bacteria and plant detritus as carbon and nitrogen resources for the kelp bed filter-feeder *Choromytilus meridionalis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 22:127-139.
- Seki, H. y O.D. Kennedy. 1969. Marine bacteria and other heterotrophs as food for zooplankton in the Strait of Georgia during the winter. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 26:3165-3173.
- Simon, M. y F. Azam. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51:201-213.
- Sindermann, C.J. y D.V. Lightner. 1988. *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*. Elsevier. Amsterdam.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman and Co., New York. 859 pp.
- Soli, C. 1964. A system for isolating phytoplankton organisms in unialgal and bacteria-free culture. *Limnol. Oceanogr.* 9:265-267.
- Sorgeloos, P. y P. Léger. 1990. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. Presented at World Aquaculture 90, Halifax-Canada. June 10-14, 1990.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density, p. 321-343. En: *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement* ( J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press, Cambridge.

- Starr, T.J., M.E. Jones y D. Martinez. 1957. The production of vitamin B<sub>12</sub>-active substances by marine bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 2:114-119.
- Suslick, K.S. 1989. The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*, february:80-86.
- Suslick, K.S. 1990. Sonochemistry. *Science* 247:1439-1444.
- Trujillo Valle, M. de L. 1993. La Colección de Microalgas del CICESE. Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura. CICESE. 103 pp. CIACT9301.
- Tubiash, H.S. 1975. Bacterial pathogens associated with culture bivalve mollusk larvae, p. 61-71. En: *Culture of marine invertebrate animals* ( W.L. Smith y M.H. Chanley, eds.). Plenum Press, New York.
- Ukeles, R. y J. Bishop. 1975. Enhancement of phytoplankton growth by marine bacteria. *J. Phycol.* 11:142-149.
- Vahl, O. 1972. Particle retention and relation between water transport and oxygen uptake in *Chlamys opercularis* (Bivalvia). *Ophelia* 10:67-74.
- Walsh, D.T., R.A. Kraus, C.A. Withstandley, S.M. Talin y E.J. Petrovits. 1985. Dimensioning of a mass algal culture facility for the temperate zone nursery culture of bivalve molluscs. *J. World. Maricul. Soc.* 16:451-463.
- Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60:231-241.
- Williams, P.J. LeB. 1981. Incorporation of microheterotrophic processes into classical paradigm of the planktonic food web. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* 5:1-28.
- Williams, P.J. LeB. 1984. Bacterial production in the marine food chain: The Emperor's new suit clothes. En: *Heterotrophic activity in the Sea* (J.E. Hobbie y P.J. LeB. Williams, eds.). Plenum Press. Nato Conference Series IV:15.
- Wolter, K. 1982. Bacterial incorporation of organic substances released by natural phytoplankton populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 7:287-295.
- Wright, R.T., R.B. Coffin, C.P. Ersing y D. Pearson. 1982. Field and laboratory measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* 27:99-110.

Yasuda, K. y N. Taga. 1980. A mass-culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. La mer (Bull. Soc. Franco-Jpn. Oceanogr.) 18:55-62.

Zobell, C.E. y C.B. Feltham. 1937-8. Bacteria as food for certain marine invertebrates. J. mar. Res 1:312-327.

**APENDICES**

## Apéndice 1

**BACTERIAL INTERACTIONS IN *Skeletonema costatum* Cleve (Bacillariophyceae)  
CULTURES**

**Roxana Rico-Mora and Domenico Voltolina**

**Departamento de Acuicultura  
Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada  
AP 2732, 22800 Ensenada, Baja California, México**

**Keywords:** Bacteria, interspecific relationships, bacteriostasis, antibiosis

**Running title:** Bacteria in diatom cultures

## RIASSUNTO

Si isolarono cinque ceppi di batteri da colture della diatomea *Skeletonema costatum* Cleve. La corta durata della fase di crescita esponenziale e il basso numero di duplicazioni durante la fase successiva di crescita di due ceppi, coltivati in terreno Zobell diluito 1:5, indicano che questi sono rapidamente limitati dalla scarsa disponibilità di nutrienti. Ambedue hanno attività antibiotica o batteriostatica verso due degli altri ceppi, che é presumibilmente una loro strategia di sopravvivenza.

## ABSTRACT

Five bacteria strains were isolated from stock cultures of the diatom *Skeletonema costatum* Cleve. Slow growth and short duration of the exponential growth phases of two of the strains cultured in 1/5 strength Zobell medium indicate that these strains quickly become nutrient limited. Both strains showed antibiotic and bacteriostatic activity against two of the other strains isolated from the algal cultures. We speculate that this is probably a survival strategy of the slow growing strains.

## INTRODUCTION

Among the several species of microalgae used in aquaculture, the diatom *Skeletonema costatum* Cleve is traditionally considered an important food source for the early larval stages of penaeid shrimps (Mock and Neal, 1974; Liao *et al.*, 1983). These crustaceans are susceptible to several bacterial diseases, especially in the intensive culture conditions often used in commercial production (Lightner, 1988). Several authors have shown that this diatom is auxotrophic (Provasoli and Carlucci, 1974; Ukeles and Bishop, 1975) and grows better in the presence of accompanying bacteria (Johnston, 1936; Berland *et al.*, 1970), which use the extracellular products secreted by the microalgae (Haines and Guillard, 1974) and provide at the same time vitamins or other growth factors.

Microalgal cultures have been often associated with the outbreak of diseases of bacterial origin in commercial aquaculture facilities (Prieur and Carval, 1979; Brown *et al.*, 1989), mostly due to several *Vibrio* species which need a rich organic substrate for growth.

In mass microalgal cultures the concentration of organic substances increases rapidly due to the extracellular products of microalgae. Bacteria capable of sustained growth in low nutrient concentrations would presumably use these organics while they are being produced, which would maintain unsuitable conditions for growth of other bacteria, such as the pathogenic species. Aiming to find at least one strain capable of sustained growth in nutrient-poor media we isolated several bacteria strains present in the stock cultures of the *Skeletonema costatum* strain of our collection, which is used by several commercial shrimp hatcheries in Mexico. In this paper we describe their characteristics and interrelationships.

## MATERIALS AND METHODS

Cultures of *Skeletonema costatum* (clone SK-C-2; Trujillo Valle, 1993) in exponential growth and in stationary phase were sonicated to break cell clumps and to dislodge bacteria adhering to the microalgal cell walls. The cultures were diluted (1:10 to 1:10<sup>3</sup>) and then spread-plated in Zobell agar and in agar prepared with the filtrate of algal cultures, grown to stationary phase in f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962). The plates were incubated in the dark at 25° C. After five days, morphologically different colonies, isolated and maintained in Zobell agar, were characterized using the criteria listed in Table 1. The biochemical tests were performed according to Difco manual (1984). In addition, we tested our strains for glucose metabolism (Lemos *et al.*,

1985), oxidase (Kovacs, 1956), Tween 80 degradation (Hansen and Sorheim, 1991) and 0/129 sensitivity (West and Colwell, 1984). Temperature (10°, 25° and 42 °C) and salt (0, 25 and 33 ‰) tolerances were tested in Zobell agar.

The growth rate ( $\mu$ : cell divisions $\text{hr}^{-1}$ ) of each strain was determined at 25°C in 1/5 strength liquid Zobell medium. Growth was measured as changes in optical density of the cultures at 550 nm, with a Hach EL 2000 spectrophotometer. The correspondence between optical density and cell numbers was determined previously with direct counts with the acridine orange staining method (Daley and Hobbie, 1975).

Interactions amongst different bacterial strains were determined with the diffusion method by Brock and Madigan (1991) and with the side by side drop technique of Gil Turnes (1988). In the diffusion method, each strain was spread-plated in Zobell agar and one 5  $\mu\text{l}$  drop of each of the other strains, growing exponentially in liquid Zobell medium, was placed in a known position of the plate. Interactions were measured after two, five and fifteen days, as presence and size of an halo of growth inhibition of the base strain. The control was a 5  $\mu\text{l}$  drop of sterile liquid Zobell medium.

For the second method, one 5  $\mu\text{l}$  drop of the base strain was placed close to a drop of equal volume of each of the other strains. Interactions were evaluated at day five, as the ratio of the mean area of each colony of the base strain to that of the control, which was a colony grown close to a 5  $\mu\text{l}$  drop of sterile Zobell medium. Values lower than 1 are indicative of antibiotic or bacteriostatic activity of the strain placed close to the base strain. Antibiotic/bacteriostatic activity was confirmed with liquid cultures kept at 25°C for 48 hours with continuous stirring, growing the sensitive strain either in the filtrate of a culture of the inhibitor strain and measuring growth as optical density, or in mixed cultures in Zobell medium. In the latter case, 0.1 ml of 1:10<sup>4</sup> and 1:10<sup>5</sup> dilutions of the cultures were spread-plated on Zobell agar and incubated at 25°C for 48 hours. The absence of colonies of one strain indicated antibiotic activity of the other.

## RESULTS AND DISCUSSION

Only five types of morphologically different colonies (SK-01 to SK-05) were isolated in the three trials in Zobell agar and in agar enriched with the filtrate of *Skeletonema costatum* cultures. A plating efficiency of 98 % was observed in both media. All five strains were present in the four trials and the persistence of their association in our non-axenic *S. costatum* stock cultures was

confirmed in subsequent observations made at least every sixth month, up to two years after their first isolation. Combining the taxonomic criteria of Shewan (1960), Oliver (1982) and Sakata (1989), their characteristics (Table 1) suggest that, in spite of the failure to grow in TCBS agar, two strains (SK-01 and SK-02) belong to the genus *Vibrio* and the remaining to the genera *Flavobacterium* (SK-03), *Plesiomonas* (SK-04) and *Aeromonas* (SK-05).

As for interspecific relationships, the first methodological approach showed that the strains SK-01 and SK-02 are not inhibitory to each other nor to SK-04, but both inhibit growth of SK-03 and SK-05. The diameters of the halos of inhibition indicate that SK-02 was between 1.6 to 2 times as effective as SK-01. In addition, the inhibition by both strains was between 5 to 6 times stronger and increasing with time in the case of SK-03 and remained constant for SK-05 (Table 2), suggesting an antibiotic and a bacteriostatic effect, respectively.

The reduction or total lack of growth of SK-03 and SK-05 in presence of both inhibitory strains obtained with the side by side drop technique, would seem to confirm these results. However, this method showed other interactions (stimulation of SK-01 and SK-02 by SK-05 and competition of SK-01 with SK-02 and SK-04), some of which are unclear and some, like those between SK-02 and SK-04 and vice-versa, even contradictory (Table 3). For this reason, apart from the clear case of antibiosis of SK-02 for the strain SK-03, we feel that all the others should be viewed with caution. We suggest in fact that bacterial interactions should be studied with the diffusion method, in preference to the side by side drop method.

Spread-plating after 48 hours in mixed culture with liquid Zobell medium showed survival of SK-03 when challenged with SK-01 but not with SK-02. This confirms the previous results, indicating bacteriostasis in the first case and true antibiosis only in the second.

Growth of SK-03 and SK-05 inoculated in the filtrate of SK-02 (pH 6.92) and SK-05 (pH 6.97) cultures grown to stationary phase was compared to that obtained in 1/5 strength liquid Zobell medium (pH 7.40). The filtrate of SK-05 cultures was used in order to determine whether bacterial growth might be nutrient-limited in an used medium. The results again confirm antibiosis of SK-02 only against SK-03 and, given the almost complete lack of change of the initial optical density, that this effect is persistent in time (Fig. 1a). In the case of SK-05, after a short period of retarded growth that may be taken as further proof of bacteriostasis, the optical density of the cultures reached values similar to the control with used medium. Both were however lower than

that reached by the cultures in 1/5 Zobell (Fig. 1b). The consistency of lower densities of SK-05 in used medium throughout the experiment seems to indicate that this strain has higher nutrient requirements than SK-03, which grew equally well in this and in Zobell medium.

These characteristics, tested periodically and found unchanged during more than two years, reveal a number of possible interactions between strains.

The bacteriostatic or antibiotic-producing strains would seem unable to compete successfully with other strains, in nutrient-depleted medium, since their exponential growth lasted only about four hours, after which they grew with the lowest rates measured in monospecific cultures for the five strains. On the other hand, the survival of SK-03 is probably the result of its ability to grow with the fastest rate in spent medium. In addition, considering the short duration of the exponential growth of SK-01 and SK-02, their final concentrations are probably too low to achieve complete inhibition of growth of the sensitive strains.

These and other interactions should be even more complex in a mixed culture with *Skeletonema costatum*. Measuring the dissolved organic carbon in the medium of axenic cultures of this microalga we obtained values of between approximately two (exponential growth) and one (stationary phase) order of magnitude lower than that of the 1/5 Zobell medium. This suggests that the effects of substrate competition should be more pronounced.

Even if the five bacterial strains consistently coexist in our *S. costatum* cultures, we speculate that this is due to the production of bacteriostatic and antibiotic substances, as a survival strategy of the strains SK-01 and SK-02 which require high substrate concentrations. This explains their coexistence with the bacteria sensitive to those substances, but capable of fast growth in a nutrient-depleted medium. This behaviour apparently is typical of bacteria associated with algal cultures when the organic resources are used by more than one species ( Brock and Madigan, 1991).

Because the five bacterial strains consistently coexist in our *S. costatum* cultures, we speculate that the production of bacteriostatic and antibiotic substances is a survival strategy of the strains SK-01 and SK-02 which require high substrate concentrations. This explains their coexistence with the bacteria sensitive to those substances, but capable of fast growth in a nutrient-depleted medium. This behaviour apparently is typical of bacteria associated with algal cultures when the organic resources are used by more than one species ( Brock and Madigan, 1991).

## ACKNOWLEDGMENTS

Victoria Orozco Borbon put at our disposal her laboratory facilities. Ramon Cajal Medrano performed the organic carbon analyses. Julio Villaescusa Celaya provided invaluable assistance. Farooq Azam and Phillippe Douillet made many helpful suggestions and critically read the manuscript.

## REFERENCES

- BERLAND B. R., BONIN D. J. & MAESTRINI S. Y. (1970). Study of bacteria associated with marine algae in culture. III. Organic substrates supporting growth. *Mar. Biol.* 5: 68-76.
- BROCK T. D. & MADIGAN M. T. (1991). *Biology of microorganisms*. 6th edn. Prentice-Hall, New Jersey.
- BROWN M. R., JEFFREY S. W. & GARLAND C. D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. CSIRO Marine Laboratories Rep. 205. CSIRO Australia.
- DALEY R. J. & HOBBIE J. E. (1975). Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceanogr.* 20: 875-882.
- DIFCO MANUAL. (1984). Difco Laboratories, Detroit.
- GIL TURNES S. (1988). Antimicrobial metabolites produced by epibiotic bacteria: their role in microbial competition and host defense. Ph. D. thesis, University of California, San Diego.
- GUILLARD R. R. L. & RYTHER J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- HAINES K. C. & GUILLARD R. R. (1974). Growth of vitamin B<sub>12</sub>-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B<sub>12</sub>-producing marine bacteria. *J. Phycol.* 10: 245-252.
- HANSEN G. H. & SORHEIM R. (1991). Improved method for phenotypical characterization of marine bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 13: 231-241.
- JOHNSTON R. (1936). Seawater, the natural medium of phytoplankton I. General features. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 43: 247-256.
- KOVACS N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, Lond. 178: 703.
- LEMONS M. L., TORANZO A. E. & BARJA J. L. (1985). Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. *Appl. environ. Microbiol.* 49(6): 1541-1543.
- LIAO I. C., SU H. M. & LIN H. H. (1983). Larval foods for penaeid prawns. In: *CRC Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture* (J.P. McVey, ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 43-69.
- LIGHTNER D. V. (1988). Diseases of cultured Penaeid shrimp and prawns. In: *Disease diagnosis and control in North American Marine Aquaculture. Developments in Aquaculture and Fisheries* (C.J. Sinderman, & D.V. Lightner, eds.), Science, 17. Elsevier, Amsterdam, pp. 8-10, 42-57.
- MOCK C. R. & NEAL R. A. (1974). Penaeid shrimp hatchery systems. In: *Proceedings of the FAO CARPAS Symposium on Aquaculture in Latin America* (M. Mistakidis, ed.), vol 2, p. 9.
- OLIVER J. D. (1982). Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-Sea Res.* 29(6): 795-798.
- PLUMB J. A. & BOWSER P. R. (1983). *Microbial fish disease laboratory manual*. Alabama Agricultural Experiment Station. Auburn University, Alabama.
- PRIEUR D. & CARVAL J. P. (1979). Bacteriological and physico-chemical analysis in a bivalve hatchery: techniques and preliminary results. *Aquaculture* 17: 359-374.

- PROVASOLI L. & CARLUCCI A. F. (1974). Vitamins and growth regulators. In: *Algal physiology and biochemistry* (W.D. Stewart, ed.), University of California Press, Berkeley, pp. 741-787.
- RODINA A. G. (1972). *Methods in aquatic Microbiology*. University Park Press, Baltimore
- SAKATA T. (1989). Microflora of healthy animals. In: *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish* (B. Austin & D.A. Austin, eds.), Ellis Horwood Limited, Chichester, pp. 141-163.
- SHEWAN J. M., HOBBS G. & HODGKISS W. (1960). A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. *J. appl. Bacteriol.* 23(3): 379-390.
- TRUJILLO VALLE M. DE L. (1993). La colección de microalgas del C.I.C.E.S.E. Informe Técnico. Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura. CIACT9301. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada.
- UKELES R. & BISHOP J. (1975). Enhancement of phytoplankton growth by marine bacteria. *J. Phycol.* II: 142-149.
- WEST P. A. & COLWELL R. R. (1984). Identification and classification of Vibrionaceae: An overview. In: *Vibrios in the environment* (R.R. Colwell, ed.), John Wiley & Sons, New York, pp. 285-363.

**Figure 1. Growth curves of the bacterial strains SK-03 (a) and SK-05 (b) in 1/5 strength Zobell medium (full circles) and in cell-free media used to grow to stationary phase the strains SK-02 (white triangles) and SK-05 (full triangles). Bars: 95% confidence intervals; where not indicated, this lies within the symbols.**

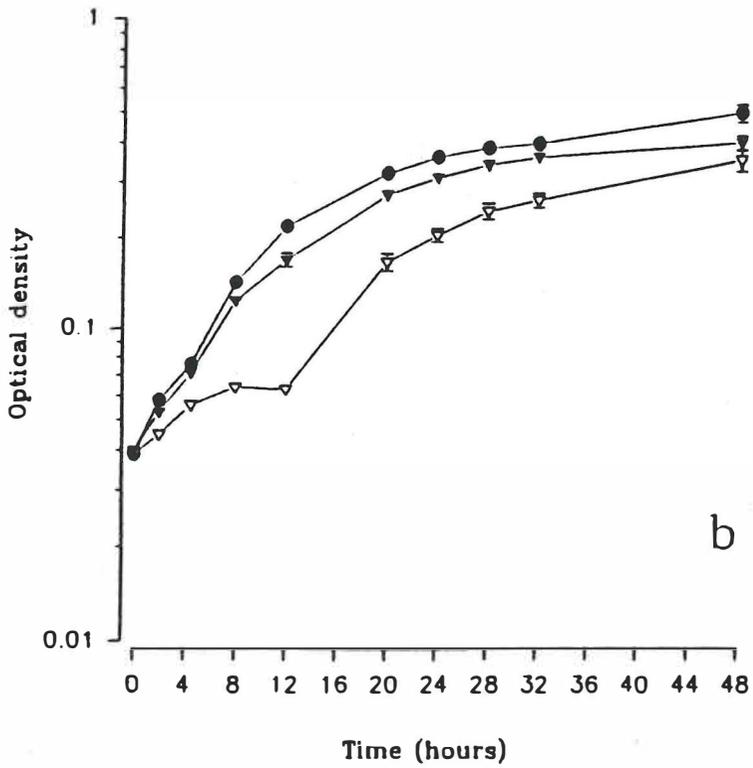
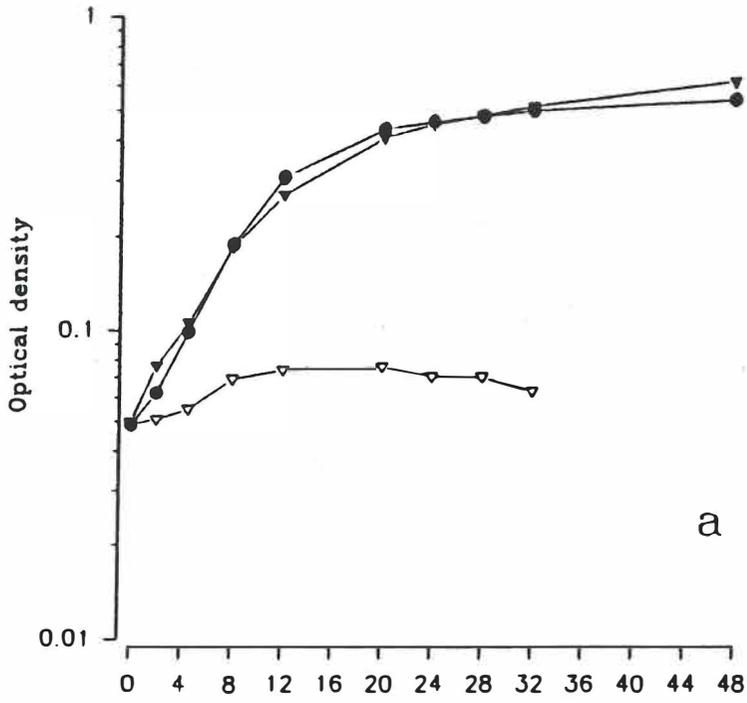


Table 1. Characteristics of the bacterial strains SK-01 to 05, isolated from cultures of *Skeletonema costatum* Cleve. For colony morphology the terminology is that of Plumb and Bowser [26] and of Rodina [27]<sup>(1)</sup>. F : fermentative; NG : no growth; <sup>(2)</sup> : positive at 150 µg.

STRAIN	SK-01	SK-02	SK-03	SK-04	SK-04
Colony morphology:					
Size (mm)	1.31	3.48	1.03	1.59	2.70
Form ( <sup>1</sup> : Shape)	circular	irregular	circular	circular	circular
Elevation ( <sup>1</sup> : Profile)	pulvinate	flat	convex	flat	flat
Margin	undulate	undulate	entire	entire	entire
Optical characteristics	opaque	opaque	opaque	iridescent	iridescent
Structure ( <sup>1</sup> )	grainy	grainy	grainy	grainy	grainy
Pigment	-	-	orange	-	-
Cell:					
Shape	rod	rod	coccus	coccus	short rod
Gram reaction	-	-	-	-	-
Motility	+	+	-	-	-
Biochemical characterization:					
Glucose metabolism	F	F	F	F	F
Oxidase	+	+	-	+	+
Acid from glucose	+	+	-	-	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-
Methyl red (35 and 25 °C)	- +	- +	- -	+ -	- -
Voges-Proskauer	-	-	NG	-	NG
DNase	+	+	NG	+	+
Tween 80	+	+	+	-	-
0/129 sensitivity	+	+	+	- <sup>(2)</sup>	-

Table 1. (continued)

STRAIN	SK-01	SK-02	SK-03	SK-04	SK-05
<b>Growth in:</b>					
TCBS	-	-	-	+	-
EMB	-	-	-	-	-
<b>Growth at different temperatures:</b>					
10 °C (at day 7)	-	-	+	+	+
25 °C	+	+	+	+	+
42 °C	+	+	+	+	+
<b>Growth at different salinities:</b>					
0 ‰	+	+	+	+	+
25 ‰	+	+	+	+	+
33 ‰	+	+	+	+	+
<b>Growth rates(<math>\mu</math>) in divisions.h<sup>-1</sup>. In parenthesis, duration (hours) of the exponential and of the slow growth phases.</b>					
$\mu$ (exponential)	0.26	0.35	0.27	0.27	0.24
hours	(4)	(4)	(4)	(4)	(4)
$\mu$ (slow growth)	0.06	0.08	0.18	0.12	0.12
hours	(4)	(4)	(20)	(20)	(20)

**Table 2. Diameter (in mm), at different time intervals, of the halo of inhibition of growth of the bacterial strains SK-03 and 05, by the strains SK-01 and 02.**

		Time (days)			
Inhibitor	Inhibited	2.0	2.5	5.5	15.0
SK-01	SK-03	3.0	4.0	5.0	6.4
	SK-05	0.5	0.5	0.5	0.5
SK-02	SK-03	5.0	6.0	8.0	11.5
	SK-05	1.0	1.0	1.0	1.0

Table 3. Surface area (in mm<sup>2</sup>) of the colonies of bacterial strains SK-01 to 05 grown for five days in Zobell agar medium (control), or side by side with the strains of the left column. In parenthesis, treatment/control ratio.

	SK-01	SK-02	SK-03	SK-04	SK-05
<b>Control</b>	26.15	47.35	19.53	20.72	32.33
<b>SK-01</b>	--	35.96 (0.76)	7.87 (0.40)	15.30 (0.74)	27.25 (0.84)
<b>SK-02</b>	28.55 (1.09)	--	0.00 (0.00)	20.18 (0.97)	26.59 (0.82)
<b>SK-03</b>	23.89 (0.91)	46.46 (0.98)	--	20.81 (1.00)	31.58 (0.98)
<b>SK-04</b>	26.30 (1.01)	31.12 (0.66)	22.47 (1.15)	--	28.23 (0.87)
<b>SK-05</b>	32.16 (1.23)	57.42 (1.21)	21.97 (1.12)	21.63 (1.04)	--

## Apéndice 2

**EFFECTS OF BACTERIAL ISOLATES FROM *Skeletonema costatum* CULTURES  
ON THE SURVIVAL OF *Artemia franciscana* NAUPLII.**

Roxana Rico-Mora and Domenico Voltolina

Departamento de Acuicultura

Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada

AP 2732, 22800 Ensenada, Baja California, México

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio alginolyticus*; bacteria in diatom cultures;  
*Artemia franciscana*; pathogenicity

**Running title:** Survival of *Artemia*

## Summary

Axenic *Artemia franciscana* nauplii were challenged with five bacteria strains isolated from a *Skeletonema costatum* culture (two *Vibrio* spp; *Flavobacterium* sp; *Plesiomonas* sp and *Aeromonas* sp) and with the known pathogens *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. After four days, mortalities were close or equal to 100 % with the two pathogenic *Vibrio* and were similar or lower than the control treatments (unchallenged nauplii) with the other bacteria strains. This confirms that *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* are pathogenic to *Artemia* and that the five other strains are not. Given the higher survival with some of these, *Artemia* nauplii probably used them as food.

## INTRODUCTION

The mass production of juvenile stages of aquatic organisms for aquaculture entails the use of intensive larval culture systems, which often leads to high mortalities due to pathogenic or opportunistic bacteria, mainly *Vibrio* and *Pseudomonas* (R.A. Murchelano and J. Bishop, *J. Fish. Res. Bd. Canada* **32**, 739-745, 1975), which may be introduced to the rearing tanks with the larval food (C.J. Langdon, *Biol. Bull.* **164**, 227-235, 1983).

*Artemia* spp. nauplii are the food of choice in many fish and crustacean production systems (P. Sorgeloos and P. Léger, *World Aquaculture* **90**, Halifax-Canada, 1990). Since they are usually obtained from hypochlorite-treated cysts (P. Sorgeloos, E. Bossuyt, E. Lavina, M. Baeza-Mesa and G. Persoone, *Aquaculture* **12**, 311-315, 1977), these nauplii are initially bacteria-free. However, in many cases they are maintained in mixed cultures with microalgae to improve their dietary value (L.V. Sick, *Mar. Biol.* **35**, 69-78, 1976), or because larger instars are more suitable as food (R. Benijts, E. Van Voorden and P. Sorgeloos, *In 10<sup>th</sup> European Symp. Marine Biology Vol. 1 Mariculture*. G. Persoone and E. Jaspers, Eds., Universa Press. Wetteren, Belgium, 1976).

In these cases nauplii mortalities may ensue, due to the bacteria invariably present in microalgae mass cultures, where they may establish a complex network of algae-bacteria and bacteria-bacteria relationships (C. Nalewajko, K. Lee and P. Fay, *Microb. Ecol.* **6**, 199-207, 1980). Some of these communities may become typical of an algal culture in stable conditions, as our laboratory cultures of the diatom *Skeletonema costatum*, which have shown throughout the years the consistent presence of the same five bacteria species. Two of them pertain to the genus *Vibrio* and the others to the genera *Flavobacterium*, *Plesiomonas* and *Aeromonas*.

In this paper we compare the survival of *Artemia franciscana* nauplii when challenged with these bacteria and with the known *Artemia* pathogens *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*.

## MATERIALS AND METHODS

Survival of *Artemia franciscana* nauplii to exposure to the five bacteria strains isolated from *Skeletonema costatum* cultures and to *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* was measured in triplicate in two experiments with the seven bacteria strains simultaneously, with an initial concentration of two and one nauplius ml<sup>-1</sup> in the first and the second assay, respectively. The controls were unchallenged nauplii, with the same densities but in quadruplicate. Commercial (San Francisco Bay Brand, Inc.) *Artemia* cysts were decapsulated in sodium hypochlorite and the emerged nauplii, washed in a 0.05 % merthyolate solution, were aseptically transferred to the respective culture vessels with 50 ml of sterile seawater, placed in a constant temperature water bath at 25°C.

The five bacteria strains from *S. costatum* cultures (SK-01 and SK-02: *Vibrio* sp. 1 and 2; SK-03: *Flavobacterium*; SK-04: *Plesiomonas* and SK-05: *Aeromonas*) and those of the two pathogens were grown at 25° C to the end of their respective exponential growth phase in 1/5 strength 2216E liquid medium (C.K. Oppenheimer and C.E. Zobell, *J. Mar. Res.* 11, 10-18, 1952). The bacteria cells were then harvested by centrifugation, washed twice, resuspended in 10 ml of sterile seawater and added to the nauplii cultures at a final concentration of 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>.

The percentages of survival to this treatment were measured after four days, during which no further bacteria additions were made. After arcsine transformation these percentages were compared by one way analysis of variance and with an LSD a posteriori test ( $\alpha = 0.05$ ; R.R. Sokal and F. Rohlf, *Biometry*. W.H. Freeman and Co., New York, 1981).

## RESULTS AND DISCUSSION

The percentages of survival were generally higher in the first assay. This might reflect a decay in cyst quality, which may occur rapidly after storage in a non-inert atmosphere. On the other hand, variability between assays of this type has been reported by Y.P. Martin and B.M. Mengus (*Aquaculture* 10, 253-262, 1977) and P. Douillet and C.J. Langdon (*Biol. Bull.* 184, 36-51, 1993). It probably depends from factors not considered in the assay, such as differences in initial handling or in water quality, which act equally on all organisms and therefore do not alter the overall results.

The mean mortality of *A. franciscana* nauplii challenged with the two pathogenic *Vibrio* strains was consistently close to 100 %, higher but overlapping the confidence limits of the

control treatments. These showed survival percentages equal or lower than those with the bacteria isolated from *S. costatum* cultures. In experiment 1 survival was highest in the treatment with SK-03 and in experiment 2 with SK-05 closely followed by SK-03 (Fig. 1 and Table 1).

Although survival was measured after four days in culture, maximum mortalities were in fact observed after 24 hours with *Vibrio alginolyticus*, and after 48 with *V. parahaemolyticus*, which confirms their pathogenicity to *Artemia* already reported by D.C. Gunther and A. Catena (*In The Brine Shrimp Artemia* Vol. 1 Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers, Eds., Universa Press. Wetteren, Belgium, 1980).

The general lack of difference between mortalities in the control treatments and those where *Artemia* was challenged with the SK bacteria strains, show that mortalities were due to starvation and not to the fact that these bacteria were pathogenic. The tendency to a higher survival in the treatments with bacteria, which sometimes reached the level of significance, is probably due to the fact that they were used as food or had an otherwise beneficial effect on survival. Similar results were obtained with other aquatic organisms by C.J. Langdon and R.I.E. Newell (*Mar. Ecol. Prog. Ser.* **58**, 299-310, 1990) and P. Douillet and C.J. Langdon (*Biol. Bull.* **184**, 36-51, 1993) and, with *Artemia*, by K. Yasuda and N. Taga (*La mer, Bull. Soc. Franco-Jpn. Oceanogr.* **18**, 55-62, 1980) and P. Intriago and D.A. Jones (*Aquaculture* **113**, 115-127, 1993).

Figure 1. Box and whisker plot of the percentages of survival of *Artemia franciscana* nauplii with different bacteria strains. C: control, unchallenged nauplii; 1 to 5: isolates SK-01 to 05; VA and VP: *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*, respectively. Exp. 1: experiment 1; Exp. 2: experiment 2. Note the scale change. Box: 25 to 75 percentiles; whiskers: 5 to 95. Horizontal line in box: median.

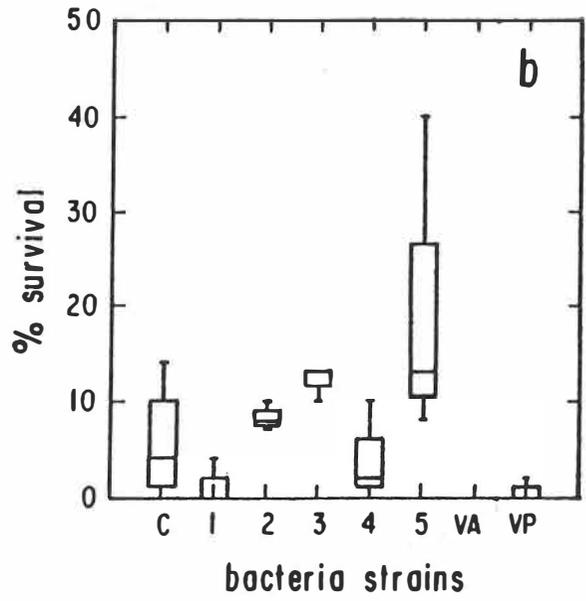
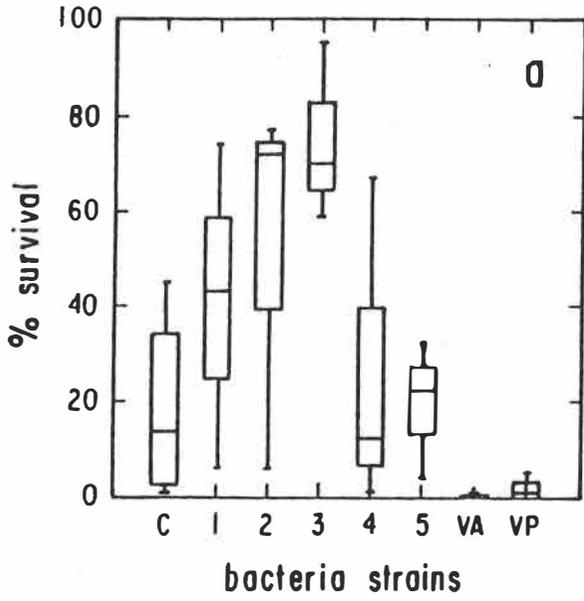


Table 1. Means (X) and standard deviations (S) (after arcsine transformation) of the survival of *Artemia franciscana* nauplii challenged in two separate experiments with five bacteria strains isolated from *Skeletonema costatum* cultures (SK-01 to 05) and with *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*. The value in parenthesis of the second experiment is an untransformed 0% survival. The letters indicate the results of the a posteriori LSD multiple comparison of means. Example: a, ab, b signifies  $a \leq ab \leq b$  and  $a < b$ .  $\alpha = 0.05$

Experiment 1

	Control	SK-01	SK-02	SK-03	SK-04	SK-05	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
X	0.384 ab	0.666 bc	0.777 bc	1.071 c	0.471 ab	0.430 ab	0.033 a	0.109 a
S	0.289	0.396	0.460	0.245	0.441	0.206	0.058	0.113

Experiment 2

X	0.193 abc	0.067 ab	0.292 bcd	0.353 cd	0.155 abc	0.447 d	( 0 ) a	0.047 a
S	0.162	0.116	0.027	0.027	0.161	0.210		0.082